

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA MACHADO FIDELIS DO NASCIMENTO

ECOLOGIA MOLECULAR DE LEVEDURAS NEGRAS

CURITIBA  
2013

MARIANA MACHADO FIDELIS DO NASCIMENTO

## ECOLOGIA MOLECULAR DE LEVEDURAS NEGRAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Vania Aparecida Vicente

Co-orientador: Prof. Dr. Gerrit Sybren de Hoog

CURITIBA  
2013

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Nascimento, Mariana Machado Fidelis do  
Ecologia molecular de leveduras negras. / Mariana Machado Fidelis do  
Nascimento. – Curitiba, 2014.  
81 f. ; 30cm.

Orientador: Vânia Aparecida Vicente  
Co-orientador: Gerrit Sybren de Hoog

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia.

1. Leveduras 2. Micologia I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III.  
Hoog, Gerrit Sybren IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia

CDD (20. ed.) 589.23



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**“ECOLOGIA MOLECULAR DE LEVEDURAS NEGRAS”**

**Por**


**MARIANA MACHADO FIDELIS DO NASCIMENTO**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

  
**Profª. Drª. Vânia Aparecida Vicente (presidente)**

  
**Profª. Drª. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**

  
**Profª. Drª. Maria Berenice Reynaud Steffens**

  
**Drª. Renata Rodrigues Gomes**

**Curitiba, 29 de abril de 2013.**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por iluminar o meu caminho e me dar forças durante esta caminhada.

Aos meus pais, José e Mariza, agradeço pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Ambos sempre serão meu exemplo de determinação, coragem e perseverança.

Ao meu irmão Francisco pelo carinho e pela presença sempre constante em minha vida.

A minha família avós, tios e primos, pelo incentivo e por compreenderem minha ausência em muitos momentos festivos.

Agradeço aos colegas de laboratório Rafaela, Mariana Porsani, Angela, João Guilherme, Joyce Ana, Anna Caroline, Mariana Midory, Wellison, Mônica, Dicler, Paulo Marangoni, Camila, Carolina, Gheniffer e Renata pela amizade e apoio em todos os momentos.

A amiga Germana D'Ávila dos Santos pela paciência, amizade e os inúmeros momentos de descontração, sem sua amizade o mestrado não teria sido o mesmo.

Ao técnico e amigo Jason Lee Furie, pela ajuda nos experimentos e principalmente pela sua amizade, paciência e companheirismo.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Patologia Básica Eliana, Luciana, Luciane, Manoel Felipe e Evelin.

A minha orientadora, professora Vania Aparecida Vicente pela orientação, oportunidade e incentivo.

Ao professor Walter Boeger pela paciência e esclarecimentos proporcionados.

As professoras Ida C. Pimentel e Vanessa K. Cordeiro, pelas valiosas considerações e sugestões na banca de qualificação.

As professoras Andréa Emília Stinghen e Lucy Ono pelos ensinamentos proporcionados durante a prática de docência.

A Universidade Federal do Paraná, ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, a Coordenação do Curso, e a todos os professores pelos conhecimentos passados e a formação proporcionada.

Ao Centro de Biodiversidade Fúngica, CBS-Utrecht- Holanda pela linhagens cedidas.

A CAPES pelo apoio financeiro e ao programa REUNI pela concessão de bolsa.

A todos que de alguma forma fizeram parte desta etapa, obrigada a todos!

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino”.

Paulo Freire

## RESUMO

As leveduras negras são Ascomicetos cuja principal característica é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas, e pertencem às ordens *Dothideales* e *Chaetothyriales*. O oligotrofismo destes agentes os torna hábeis a sobreviver em diversos substratos. Sendo assim, estudos da ecologia destes agentes são de fundamental importância para o entendimento da evolução epidemiológica das doenças causadas por estes micro-organismos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a ecologia de leveduras negras e avaliar a atividade de enzimas fenoloxidase e lacase visando à aplicação biotecnológica. Neste estudo foram utilizadas 43 linhagens de diferentes gêneros de leveduras negras. A termotolerância foi determinada num intervalo de 15 a 40°C. A tolerância ao pH foi verificada num intervalo de 2,5 a 9 em intervalos de 0,5. A atividade enzimática foi verificada em placas com meio sólido contendo os substratos Guaiacol 0,2% para enzima lacase e ácido tânico 0,5% para enzima fenoloxidase. Os resultados obtidos mostraram que as linhagens de *Exophiala* apresentaram melhor crescimento entre 24 e 30°C. Os isolados ambientais pertencentes ao gênero *Cladophialophora* apresentaram crescimento a 40 °C, sendo o ótimo a 33°C. Quanto ao pH, a faixa ótima para o crescimento das linhagens variou entre 4 e 5,5. De maneira geral, as linhagens toleram uma ampla variação de pH, sendo que foi observado uma preferência ao pH ligeiramente ácido. Seis linhagens apresentaram atividade fenoloxidase e todas apresentaram atividade para a enzima lacase. As quatro linhagens selecionadas para a assimilação de hidrocarbonetos foram capazes de crescer na presença destes compostos. A partir destes resultados, verificou-se que as linhagens estudadas apresentaram variação em relação à tolerância a temperatura, pH e atividade enzimática testada, o que pode representar diferenças no potencial de virulência e esclarecer os diferentes perfis epidemiológicos destes agentes, assim como identificar isolados com potencial biorremediador.

**Palavras chave:** Ecologia. Atividade enzimática. Leveduras negras.



## ABSTRACT

Black yeasts are Ascomycetes which main characteristic is the dark pigmentation in the cell wall of vegetative and reproductive cells and belonging to the orders Dothideales and Chaetothyriales. As those agents are oligotrophic, they are able to survive in substrates. Thus, studies of these agents ecology are important for understanding the epidemiologic evolution of diseases caused by those microorganisms. The objective of the present work is studying the ecology of black yeasts and evaluating the activity of enzymes phenoloxidase and laccase aiming biotechnological application. In this study, 43 lineages of different genus of black yeasts were used. Thermotolerance was determined in a range of 15 to 40°C, measuring lineages radial growth in medium MEA 2% during 21 days. The pH tolerance was verified in pH range from 2,5 to 9 in intervals of 0,5. Enzymatic activity was verified in plates of solid medium containing as substrates Guaiacol 0,2% for laccase, and 0,5% tannic acid for phenoloxidases. The results showed that *Exophiala* lineages present better growth between 24 and 30 °C. Environmental isolates belonging to genus *Cladophialophora* presented growth at 40°C, being optimum at 33°C. Regarding pH, the optimum range for lineage growth varied between 4 and 5,5. In general, the lineages tolerate a wide pH range, whereas it was observed a preference to slightly acid pH during development. Six lineages presented activity to phenolxidase and all lineages presented activity to laccase enzyme. All four lineages selected to hydrocarbon assimilation were able to grow in the presence of those compounds. From these results, it was observed that studied lineages presented variation regarding temperature tolerance, pH and activity to tested enzymes, what may represent differences in virulence potential and consequently may explain different epidemiologic profiles of those agents, as identify the isolates with bioremediation potential.

**Key words:** Ecology. Enzymatic activity. Black yeasts.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – PADRÃO DE POSITIVIDADE ADOTADO NO TESTE QUALITATIVO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FENOLOXIDASES DAS LINHAGENS ESTUDADAS.....34
- FIGURA 2 – PERFIL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – ENZIMA LACASE EM MEIO CONTENDO GUAIACOL COMO SUBSTRATO.. .....35
- FIGURA 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Exophiala* e *Cladophialophora* BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA. A LINHAGEM REFERÊNCIA DE *Phaeococcomyces catenatus* FOI UTILIZADA COMO GRUPO EXTERNO. O SUPORTE DE BOOTSTRAP FOI CALCULADO A PARTIR DE 100 REPETIÇÕES; VALORES  $\geq 35$  A 100 SÃO MOSTRADOS ACIMA E ABAIXO DOS RAMOS; RAMOS APOIADOS ESTÃO EM NEGRITO. ....41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- LINHAGENS ESTUDADAS .....	30
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA líquidos e as DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO utilizados para o TESTE DE ASSIMILAÇÃO DE ÓLEO MINERAL E CORANTE REMAZOL AZUL (VOLUMES $\mu$ L). .	36
TABELA 3 - LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA .....	38
TABELA 4 - AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FENÓLÓXIDASE E LACASE .....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA ) 2%.DAS LINHAGENS DO CLADO SALMONIS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	42
GRÁFICO 2 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2% DAS LINHAGENS DE <i>Exophiala</i> NASCIDAS DA ÁGUA EM DIFERENTES TEMPERATURAS, EM MEA 2%.....	43
GRÁFICO 3 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM AGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2% DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Exophiala</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS, .....	44
GRÁFICO 4 - MÉDIA DA TEMPERATURA ÓTIMA DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS. ....	44
GRÁFICO 5 - MÉDIA DO PH ÓTIMO DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS.....	45
GRÁFICO 6 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE, DAS ESPECIES DO CLADO SALMONIS EM DIFERENTES PH. ....	45
GRÁFICO 7 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2%DAS LINHAGENS DE <i>Exophiala</i> NASCIDAS DA ÀGUA EM DIFERENTES PH.....	46
GRÁFICO 8 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2% DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE DIFERENTES ESPECIES DE <i>Exophiala</i> E <i>Cladphialophora</i> , EM DIFERENTES PH.....	47
GRÁFICO 9 - AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FENOLOXIDASE E LACASE, DAS LINHAGENS REFERENCIAS E ISOLADOS AMBIENTAIS ESTUDADOS.....	49

GRÁFICO 10 - AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FENOLOXIDASE E LACASE DAS LINHAGENS REFERENCIAS E ISOLADOS AMBIENTAIS ESTUDADOS.....	49
GRÁFICO 11 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE <i>Exophiala</i> EM MEIO MÍNIMO SEM DEXTROSE (TRATAMENTO A), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C SOB AGITAÇÃO A 120 RPM.....	50
GRÁFICO 12 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE <i>Exophiala</i> EM MEIO MÍNIMO SEM DEXTROSE E ÓLEO MINERAL (TRATAMENTO C), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM.....	51
GRÁFICO 13 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE <i>Exophiala</i> EM MEIO MÍNIMO SEM DEXTROSE E CORANE REMAZOL AZUL (TRATAMENTO E), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM.....	51
GRÁFICO 14 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE <i>Exophiala</i> EM MEIO MÍNIMO COM DEXTROSE (TRATAMENTO B), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM .....	52
GRÁFICO 15 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE <i>Exophiala</i> EM MEIO MÍNIMO COM DEXTROSE E ÓLEO MINERAL (TRATAMENTO D), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM.....	52
GRÁFICO 16 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE <i>Exophiala</i> EM MEIO MÍNIMO COM DEXTROSE E CORANE REMAZOL AZUL (TRATAMENTO F), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM.....	53
GRÁFICO 17 - CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL (AUSÊNCIA DE FONTE DE CARBONO) PARA OS ISOLADOS AMBIENTAIS DE DIFERENTES ESPECIES DE <i>Exophiala</i> . ....	53

GRÁFICO 18 - CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL (PRESENÇA DE FONTE DE CARBONO) PARA OS ISOLADOS AMBIENTAIS DE DIFERENTES ESPECIES DE <i>Exophiala</i> . ....	54
--	----

## **LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS**

μL - Microlitro

18S - Subunidade ribossomal menor

28S - Subunidade ribossomal maior

ANOVA - Análise de variância

DNA<sub>r</sub> - Ácido desoxiribonucleico ribossomal

DNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

ITS - Internal transcribed spacer

DCL – Doença do caranguejo letárgico

mg - Miligramas

PCR - reação em cadeia da polimerase

MgCl – Cloreto de magnésio

NaOH - Hidróxido de sódio

ng - Nanogramas

pb - Pares de bases

Tris - 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

UV – Radiação ultravioleta

SSU – Small ribosomal subunit

EPS - Polissacarídeos extracelulares

DHN - 1,8-dihidroxi-naftaleno

GDHB - Gama-glutaminil-4-hidroxibenzeno

DOPA - 3,4-dihydroxyphenylalanine

HPAS - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures

NaCl – Cloreto de sódio

CTAB - Cetyltrimethylammonium bromide

nm – Nanômetros

mm – Milímetros

PEG – Polietilenoglicol

ddNTP - Didesoxirribonucleotídeo trifosfato

NaNO<sub>3</sub> – Nitrato de sódio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato de potássio monobásico

KCl – Cloreto de potássio

MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O – Sulfato de magnésio heptahidratado

FeSO<sub>4</sub> – Sulfato de ferro

ZnSO<sub>4</sub> – Sulfato de zinco

MMSD - Meio mínimo sem dextrose

MMCD - Meio mínimo com dextrose

CIA - Clorofórmio álcool isoamílico



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	13
2.1	GERAL	13
2.2	ESPECÍFICOS	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	13
3.1	LEVEDURAS NEGRAS: ECOLOGIA, TAXONOMIA E MARCADORES MOLECULARES	14
3.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	18
3.3	IMPORTÂNCIA CLÍNICA	21
3.4	HIDROCARBONETOS E DEGRADAÇÃO	24
3.5	FENOLOXIDASES	26
3.5.1	Lacases	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
4.1	LINHAGENS UTILIZADAS	30
4.2	REATIVAÇÃO DAS CULTURAS LIOFILIZADAS E MANUTENÇÃO	32
4.3	TESTE DE TOLERÂNCIA A TEMPERATURA	33
4.4	TESTE DE TOLERÂNCIA AO PH	33
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	33
4.6	TESTES DE ASSIMILAÇÃO DE ÓLEO MINERAL E CORANTE REMAZOL AZUL	35
4.7	DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL AO LONGO DO TEMPO	36
4.8	EXTRAÇÃO DNA	37
4.9	AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS	37
4.10	ALINHAMENTO E RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO	38

4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5	RESULTADOS .....	40
6	DISCUSSÃO .....	55
7	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	ANEXOS .....	72

## 1 INTRODUÇÃO

As leveduras negras formam um grupo de fungos heterogêneos quanto à taxonomia e filogenia que abrange membros Ascomicetos pertencentes quase exclusivamente as ordens *Dothideales* e *Chaetothyriales* (DE HOOG *et al.*, 2000; SATOW, 2008). A principal característica deste grupo é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas (DIXON; POLAK-WISS, 1991); e pelo menos, durante uma parte do seu ciclo de vida, podem produzir células leveduriformes melanizadas (DE HOOG *et al.*, 2000).

As leveduras negras pertencentes à ordem *Dothideales* exibem habilidade adaptativa para sobrevivência em condições ambientais hostis (STERFLINGER *et al.*, 1999; RIBEIRO, 2008) enquanto que a ordem *Chaetothyriales* abrange os patógenos e oportunistas de hospedeiros humanos, causadores de doenças como a Cromoblastomicose, Micetoma e Feohifomicose (MCGINNIS, 1992),

De acordo com Alviano e colaboradores (2004) a maioria dos fungos negros são sapróbios habituais do solo e de vegetais em decomposição. A infecção depende, basicamente, de três fatores para se estabelecer: a resistência do hospedeiro, a quantidade do inóculo e a virulência do fungo.

A termotolerância é um importante fator de virulência nas leveduras negras e a tolerância à temperatura do corpo humano é um requisito essencial para a patogenicidade (DE HOOG *et al.*, 2000; BADALI *et al.*, 2008), bem como a relação entre a temperatura máxima de crescimento (DE HOOG *et al.*, 2011) e a capacidade de crescer a 37 °C, pois estes parecem ser fatores decisivos para a patogênese em leveduras negras e definir a escolha do hospedeiro (STERFLINGER, 2006; DE HOOG 2011).

Outro fator de virulência verificado nas leveduras negras são as melaninas, por exercerem um papel protetor ao estresse ambiental (RIBEIRO *et al.*, 2006; FENG *et al.*, 2012). Sendo assim, quando estão parasitando os tecidos dos hospedeiros as melaninas podem, por exemplo, reduzir a fagocitose, promover proteção contra enzimas hidrolíticas produzidas por macrófagos e contra os derivados de oxigênio e nitrogênio (BOCCA *et al.*, 2006).

De maneira geral as melaninas fúngicas são formadas pela oxidação de diversos compostos fenólicos realizados por enzimas fenoloxidades, divididas em dois subgrupos, lacases e tirosinases (GRIFFITH, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2006).

As lacases são enzimas secretadas por várias espécies de fungos durante seu metabolismo secundário e nos últimos anos, estudos têm sido realizados visando sua aplicação na degradação de compostos aromáticos e corantes industriais, devido a sua capacidade de clivar anéis aromáticos (SHRADDHA *et al.*, 2011).

Outra característica observada nas leveduras negras é a capacidade de assimilar hidrocarbonetos monoaromáticos e de crescer em ambientes ricos nesses componentes (STERFLINGER, PRILLINGER, 2001; WOERTZ *et al.*, 2001; PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2002). Estudos têm observado a presença desses micro-organismos em ambientes como: biofiltros para tratamento de tolueno (WOERTZ *et al.*, 2001), solo contaminado com óleo; solo poluído com gasolina; madeira tratada com conservantes fenólicos e madeira de ferrovias contaminada com creosoto (PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2006; DE HOOG *et al.*, 2006).

Devido ao potencial patogênico e ubiquidade desses fungos, estudos de isolados ambientais, procedentes de nichos ricos em hidrocarbonetos, são importantes para entender a ecologia desses micro-organismos e identificar mecanismos de virulência e potencial de patogenicidade. Além disso, podem identificar agentes promissores de biorremediação de interesse industrial, para o tratamento de poluentes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

- Estudar a ecologia de leveduras negras e avaliar o potencial enzimático da fenoloxidase e lacase de isolados ambientais visando à aplicação biotecnológica.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Determinar a tolerância quanto à temperatura e pH de leveduras negras de origem animal e ambiental;
- Avaliar o potencial enzimático oxidativo da fenoloxidase e lacase em leveduras negras;
- Determinar a capacidade de assimilação de óleo mineral e corante Remazol Azul por leveduras negras de origem ambiental;
- Identificar por meio de sequenciamento e análises filogenéticas da região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA os isolados ambientais de leveduras negras.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 LEVEDURAS NEGRAS: ECOLOGIA, TAXONOMIA E MARCADORES MOLECULARES

As leveduras negras são Ascomicetos e pertencem quase exclusivamente às ordens *Dothideales* e *Chaetothyriales* (HOOG; MCGINNIS, 1987) e são caracterizadas por possuírem um pigmento escuro, melanina, na parede celular das células vegetativas e reprodutivas (DIXON; POLAK-WISS, 1991). Definidas como fungos anamórficos capazes de produzir células leveduriformes melanizadas, pelo menos, durante uma parte do seu ciclo de vida (DE HOOG *et al.*, 2000), também são conhecidas como fungos dematiáceos.

Os membros da ordem *Dothideales* exibem habilidade adaptativa para sobrevivência em condições ambientais hostis (STERFLINGER *et al.*, 1999; RIBEIRO, 2008). Os anamórficos da família *Dothideaceae* apresentam crescimento rápido, hifas largas e multinucleadas; e a melanização é dependente dos estágios de desenvolvimento ou das condições ambientais (HAASE *et al.*, 1999; VICENTE, 2000). Quase todas as espécies pertencentes a esta família crescem em baixa atividade de água e são halotolerante ou halofílicos (DE HOOG *et al.*, 2005). Entre os dematiáceos de crescimento rápido, alguns grupos são caracterizados por possuírem conídios multicelulares, septados transversalmente e longitudinalmente (dictioporos) tais como *Alternaria*, *Stemphylium*, *Epicoccum*, *Ulocladium*. Enquanto outros gêneros como *Curvularia* e *Drecheslera*, apresentam conídios multicelulares septados apenas transversalmente. Conídios unicelulares são característicos dos gêneros sapróbios *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Aureobasidium* e *Hortaea*. (DE HOOG *et al.*, 2005; STERFLINGER *et al.*, 2001).

A ordem *Chaetothyriales* abrange os patógenos e oportunistas de humanos e animais, causadores, por exemplo, da Cromoblastomicose, Micetoma e Feohifomicose (MCGINNIS, 1992), além disso, tem-se relatado a sua presença em ambientes tóxicos e extremos, e isso se deve a sua capacidade de adaptação (PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2006). Dentro dessa ordem, encontra-se a família *Herpotrichiellaceae*, a qual reúne micro-organismos relevantes do ponto de vista

ecológico e clínico, que apresentam potencial de patogenicidade em hospedeiros animais (STERFLINGER *et al.*, 1999; DE HOOG *et al.*, 2000). As leveduras desta família são de crescimento lento, inicialmente leveduriforme, e com o tempo, a textura da colônia torna-se aveludada com hifas mononucleadas e talo regular e uniformemente pigmentado (DIXON, POLAK-WISS, 1991). As principais espécies pertencentes são as do gênero *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Capronia*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rinocladiella*, *Veronea* e *Cyphellophora* (DE HOOG *et al.*, 2000).

Na natureza, estes agentes podem colonizar diversos ambientes, os quais vêm sendo comumente isolados de substratos vegetais, madeira, solo e matéria orgânica em decomposição (MCGINNIS *et al.*, 1999; VICENTE, 2000), bem como solo contaminado com hidrocarbonetos (SATOW *et al.*, 2008). Estes fungos distribuem-se em regiões de clima tropical e subtropical (QUEIROZ-TELLES, 1996; VICENTE, 2000) ambientes semi-áridos e desertos quentes (STERFLINGER, 2006), bem como em solo de geleiras (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003; BRIDGE; NEWSHAM, 2009).

Os habitats das leveduras negras podem ser diversos, mas todos apresentam algumas condições especiais como pouca disponibilidade de nutrientes, presença de compostos aromáticos, temperaturas elevadas, radiação ultravioleta (UV), estresse osmótico ou combinações desses fatores (STERFLINGER, 2006). Recentemente, várias espécies de leveduras negras foram isoladas de ambientes não muito comuns, como máquinas de lavar louça (ZALAR *et al.*, 2011), máquinas de lavar roupas, tanques de gasolina (ISOLA *et al.*, 2013), instalações de banho a vapor e banheiros (SUDHADHAM *et al.*, 2008).

As leveduras negras do gênero *Cladophialophora* apresentam colônias restritas, pulverulentas a lanosas e verde-acinzentado a verde-oliváceo. Conidióforos ausentes ou imperceptíveis. Conídio de uma célula, seco, pouco ramificado, frequentemente com cadeias coerentes, com ou sem ramoconídio; cicatrizes conidiais quase despigmentadas (DE HOOG *et al.*, 2000), e são frequentemente isolados de matéria orgânica em decomposição e associadas a uma série de infecções em hospedeiros humanos e animais (BADALI *et al.*, 2008; VICENTE *et al.*, 2012).

As espécies do gênero *Fonsecaea* estão principalmente relacionadas a infecções subcutâneas em hospedeiros humanos (DE HOOG *et al.*, 2004, NAJAFZADEH *et*

*al.*, 2009, 2011, VICENTE *et al.*, 2012) embora recentemente foram descritas novas espécies associadas a hospedeiros animais, sendo *Fonsecaea multimorfo* causando infecção disseminada em gatos (NAJAFZADEH *et al.*, 2011) e a *F. brasiliensis* associada à infecção disseminada em caranguejos (VICENTE *et al.*, 2012). Vicente e colaboradores (2013, no prelo) descreveram as espécies de *Fonsecaea erecta* e *Fonsecaea mínima*, as quais foram isoladas do ambiente. As espécies deste gênero apresentam como principal característica micromorfológica a presença de conidióforos ramificados, com formação de conídios primários e secundários com variação da forma predominante de morfologia (DE HOOG *et al.*, 2000; VICENTE, 2000). As espécies apresentam colônias aveludadas planas ou elevadas de crescimento lento, coloração preta, olivácea ou cinza escura de reverso escuro (AL-DOORY, 1983; HOOG; GUARRO, 1995, VICENTE, 2000).

As leveduras negras do gênero *Exophiala* apresentam colônias preto-olivácea, reduzidas, viscosas no centro, característica de crescimento leveduriforme, e margens lisas, tornando-se com o passar do tempo aveludadas ou lanosas. Microscopicamente apresentam células intercaladas, cilíndricas livres, com forma de cantil ou acicular com estreitamento relativo. Conídios formados com cabeças subhialinas, parede lisa. Algumas cadeias com células esféricas são formadas com profusão de brotos (DE HOOG *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas, fungos do gênero *Exophiala* foram isolados de ambientes aquáticos de forma consistente, os mesmos não apresentando termotolerância, no entanto, estavam envolvidos em doenças em animais, principalmente os de sangue frio como peixes, anfíbios e alguns invertebrados (HOOG *et al.* 2011).

As espécies de *Exophiala* originadas de ambientes aquáticos se reúnem geneticamente em um grande clado dentro da família Herpothrichiellaceae, ordem Chaetothyriales, conhecida como Leveduras negras nascidas na água “Waterborne species” reunindo as espécies *C. coronata*, *E. angulospora*, *E. alcalophila*, *E.*



*mesophila* e *E. lacus*. (HOOG *et al.*, 2011) e as espécies do clado Salmonis, o qual reúne as espécies aquáticas do gênero *Exophiala* com potencial de infecção em hospedeiro animais de sangue frio, as quais são: *E. aquamarina*, *E. brunnea*, *E. cancerae*, *E. equina*, *E. halophila*, *E. opportunistica*, *E. pisciphila*, *E. salmonis*, *E. psychrophila*. Este mesmo clado abrange ainda a espécie *Veronaea botryosa* um agente potencial de infecções disseminadas em seres humanos.

A identificação das espécies de leveduras negras pode ser realizada primeiramente com a observação da estrutura macroscópica da colônia, a qual de maneira geral apresenta desenvolvimento caracterizado pelo aspecto escuro (marrom, verde oliva ou negro) e, microscopicamente, hifas com septos escuros (DE HOOG *et al.*, 2000).

A identificação de leveduras negras pela observação das estruturas macro e microscópicas não é o suficiente para sua classificação e como estes micro-organismos apresentam uma plasticidade morfológica e pouca diferenciação das estruturas conidiais, com possíveis variações de tamanho e formato na maioria das espécies, dificultam a determinação de espécie através da análise morfológica devido a esses aspectos (HOOG *et al.*, 1998).

Sendo assim, métodos de biologia molecular e o uso de marcadores moleculares vêm permitindo uma reconstrução segura da filogenia e consequentemente representa um ferramenta fundamental para elucidar desde uma determinada rota de infecção, no caso das lesões traumáticas até aspectos epidemiológicos (HOOG *et al.*, 2006). Dados obtidos por métodos moleculares permitem a construção de árvores filogenéticas mais precisas, auxiliando a elucidação da ecologia e evolução destes micro-organismos (VICENTE, 2000; STERFLINGER, 2006).

Para leveduras negras tem sido utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) visando à amplificação de fragmentos específicos do DNA ribossomal (DNAr), caracteristicamente repetitivo, situado em regiões específicas do genoma e presente em altas proporções em relação ao conteúdo total de DNA da espécie (VICENTE, 2000, CALIGIORNE *et al.*, 2005).

O gene DNAr contém repetições que consistem em 18S (subunidade menor), 5.8S e 28S (subunidade maior), que geralmente não apresentam variação intra-específica; e regiões internas que apresentam variações e são transcritas (ITS1 e ITS2). Dados de sequenciamento da região ITS têm sido utilizados para

identificação e caracterização de novas espécies bem como estudos de filogenia e evolução (CALIGIORNE *et al.*, 2005; DE HOOG *et al.*, 2007; ZENG *et al.*, 2007; SATOW *et al.*, 2008; BADALI *et al.*, 2008). No caso das leveduras negras, o sequenciamento da região ITS é aplicado para identificação das espécies, enquanto o da região SSU e LSU para classificação dos micro-organismos em nível de classes e definição dos gêneros (STERFLINGER, 2006; DE HOOG *et al.*, 2011). Estudo do DNA mitocondrial tem sido utilizado para estudos de diversidade em nível de população (CALIGIORNE, 2005).

Os marcadores moleculares mais usados para identificação e estudos taxonômicos destas leveduras são o sequenciamento das regiões SSU, LSU, ITS, fator de alongação 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulina e actina (ZENG *et al.*, 2006; BADALI *et al.*, 2008) e CDC42 para as espécies de relevância clínica do gênero *Fonsecaea* (SUN *et al.*, 2012). Contudo, Zeng *et al.* (2006) ao analisarem as sequências da região ITS, fator de alongação 1-  $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulina e actina de 156 linhagens de *E. spinifera* concluíram que os dados das sequências da região ITS são confiáveis para a reconstrução filogenética e identificação das espécies desta clado, não sendo necessária a análise de outras regiões para a identificação a nível de espécie.

### 3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

De acordo com de Hoog (1993), as leveduras negras mostram adaptações a uma ampla gama de condições ambientais. A presença de parede celular melanizada, capacidade de alternar entre as formas leveduriforme e filamentosa, produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) e biofilmes, permite que estas leveduras tolerem uma grande variedade de condições extremas como temperatura elevada, dessecação, elevadas concentrações de sal, variações no pH, deficiência de nutrientes e radiação UV (GOSTINCAR, 2011).

A sobrevivência destes fungos no hospedeiro humano, tido também como habitat hostil, é favorecida não somente pela presença de melanina na parede celular, mas também pela ocorrência de lipídios nessa estrutura e a termotolerância (RIBEIRO *et al.*, 2006).

No Reino fungi, espécies que não são termotolerantes tendem a ser sapróbios sem capacidade infecciosa e são raras as infecções causadas por estes fungos em humanos (DE HOOG *et al.*, 2011). A termotolerância é um importante fator de virulência nas leveduras negras (DE HOOG *et al.*, 2000). A tolerância à temperatura do corpo humano é um requisito essencial para a patogenicidade, mas essa característica pode ter sido acidentalmente adquirida através de adaptação ao habitat ambiental quente, tais como superfícies quentes em climas semi-áridos (BADALI *et al.*, 2008).

Um aspecto a ser observado é a relação entre a temperatura máxima de crescimento (DE HOOG *et al.*, 2011) e a capacidade de crescer a 37 °C, pois estes parecem ser fatores decisivos para a patogênese em leveduras negras (STERFLINGER, 2006). De maneira geral, clados que abrigam espécies capazes de crescer em temperaturas acima de 36-37 °C (Clado bantiana, dermatitidis e jeanselmei) as espécies pertencentes a estes clados podem causar infecções sistêmicas ou disseminadas em humanos, enquanto as espécies pertencentes a clados com um máximo em torno de 36-37°C (Clado carrionii e europaea) causam infecções cutâneas, subcutâneas e superficiais. As espécies do clado salmonis têm temperaturas máximas de crescimento entre 27 e 33°C, 36°C, excepcionalmente, e causar infecção superficial e no máximo infecções invasivas (LI *et al.*, 2009; DE HOOG, *et al.*, 2011).

Em espécies de veiculação hídrica, assim como as espécies do clado Salmonis, foi observada uma ligeira correlação entre a temperatura máxima de crescimento do fungo e do habitat natural do hospedeiro. A termotolerância irá determinar a escolha do hospedeiro: espécies, com temperaturas máximas de crescimento de 27-33°C podem causar doenças em animais de sangue frio, enquanto que aqueles que crescem até 40°C pode causar infecções sistêmicas em mamíferos (DE HOOG *et al.*, 2011; VICENTE *et al.*, 2012; SEYEDMOUSAVI; GUILLOT; DE HOOG, 2013). São exemplos as epizootias causadas por *Exophiala psychrophila* no salmão do Atlântico (PEDERSEN; LANGVAD, 1989), *E. salmonis* em truta (CARMICHAEL, 1966) e *E. cancerae* causando a Doença do Caranguejo Letárgico (DCL) em caranguejos que habitam áreas de manguezais ao longo da costa leste do Brasil (BOEGER *et al.* 2005, 2010).

No estudo realizado por Vicente e colaboradores (2012), verificou-se que outra espécie de levedura negra, *F. brasiliensis*, estava relacionada com a DCL, causando co-infecção. Esta espécie foi considerada um agente secundário da doença, pois foi frequentemente isolada do habitat do caranguejo, enquanto que *E. cancerae* (agente etiológico) nunca foi isolado ou detectado no ambiente de mangue, apenas nos tecidos dos caranguejos moribundos. De Hoog *et al.* (2011), estabeleceram que a temperatura ótima de crescimento para *E. cancerae* está entre 24-27° C, com um máximo de 33 ° C, enquanto que *F. brasiliensis*, apresenta um crescimento máximo a 37 ° C (VICENTE *et al.*, 2012), o que sugere que a tolerância de temperatura pode ser um fator importante na determinação da preferência pelo hospedeiro.

Outro importante fator de virulência nas leveduras negras é a presença de melanina parede celular das células vegetativas e reprodutivas (DIXON; POLAK-WISS, 1991). Melanina é um termo comum usado para pigmentos que variam do marrom ao preto, com alto peso molecular e formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (BEEL; WHEELER, 1986). As melaninas são produzidas por vários organismos, de bactérias a seres humanos podendo derivar de várias vias metabólicas, precursores, enzimas e intermediários distintos (JACOBSON, 2000). Embora as melaninas não sejam essenciais para sobrevivência da célula fúngica, contribuem para o crescimento e desenvolvimento das espécies, bem como, auxiliam na sobrevivência e competição dos fungos no meio ambiente (BEEL, WHEELER; 1986; JACOBSON, 2000).

De maneira geral, a melanina confere resistência à célula fúngica contra as células efectoras do sistema imune, pois reduz a fagocitose, protege contra derivados de oxigênio e nitrogênio, e enzimas hidrolíticas, como quitinase e glucanase (JACOBSON, 2000; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

Fungos melanizados são mais resistentes a fatores ambientais que os seus mutantes não melanizados, albinos ou fungos normalmente não melanizados (BUTLER *et al.*, 2005). Em estudo realizado por Bocca *et al.* (2006) com *Fonsecaea pedrosoi*, a melanina inibiu a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados, demonstrando que a melanização de células fúngicas é um importante fator de patogenicidade que interfere na resposta imune do hospedeiro.

Nos fungos, a biossíntese da melanina tem vários precursores naturais, incluindo 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN), gama-glutaminil-4-hidroxibenzeno (GDHB),

catecol, catecolaminas, tirosina e 3,4-dihydroxyphenylalanina (DOPA) (BLOIS, 1978; BEEL; WHEELER, 1986). A via DHN-melanina foi descrita como a mais frequentemente encontrada em ascomicetos e deuteromicetos e é o que caracteriza alguns fungos como sendo negros ou demáceos (KOGAJ, WHEELER, LANISNIK RIZNER *et al.*, 2004) e a sua produção está envolvida na patogenicidade de muitos fungos, principalmente aos pertencentes à ordem *Chaetothyriales* (FENG *et al.*, 2012).

A DHN melanina é carregada negativamente, hidrofóbica e de peso molecular elevado e surge através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou precursores indólicos (SUN *et al.*, 2012). Para formação da melanina a partir do composto DHN, passos de dimerização e polimerização podem acontecer catalisados por fenoloxidasas, tais como a tirosinase e lacases, peroxidases, e talvez também catalases (BUTLER; DAY, 1998; EDENS *et al.*, 1999). Yurlova *et al.* (2008) estudou a influência de substratos orto e para-diphenoloxidase na formação de pigmento em leveduras negras e os resultados sugeriram que o processo de melanização pode envolver mais enzimas e substratos do que aqueles geralmente conhecidos.

### 3.3 IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Os fungos negros estão relacionados etiologicamente com infecções traumáticas e sistêmicas. Muitos deles são sapróbios de crescimento rápido, porém uma parcela é responsável por casos de micoses e doenças em animais. São pertencentes à família *Herpotrichiellaceae*, caracterizada por reunir leveduras negras que exibem uma forte tendência a patogenicidade em hospedeiros vertebrados (VICENTE, 2000).

Sabe-se que as leveduras negras podem causar infecção em animais e que os animais aquáticos são infectados por fungos da ordem *Chaetothyriales* com maior frequência do que os animais terrestres e a temperatura parece ser o fator determinante na escolha pelo hospedeiro (DE HOOG, 2011). Têm sido relatadas doenças fúngicas emergentes causadas pelas leveduras negras em animais

domésticos ou selvagens e em invertebrados e vertebrados de sangue quente ou frio (SEYEDMOUSAVI; GUILLOT; DE HOOG, 2013).

Recentemente De Hoog *et al.*, (2011) relatou que espécies do gênero *Exophiala* estavam envolvidas em doenças em animais, principalmente peixes e anfíbios, e ocasionalmente em alguns invertebrados. Espécies de *E. salmonis* e *E. pisciphila* foram encontradas como patógenos em várias espécies de peixes e *E. salmonis* ainda foi encontrada causando feohifomicose em tartarugas (DE HOOG *et al.* 2000). A espécie de *E. psychrophila* causou infecção no salmão do Atlântico (*Salmo salar*). A doença causou elevada mortalidade durante quatro anos e gerou grandes perdas econômicas para os produtores no oeste da Noruega (LANGVAD *et al.*, 1985).

Seyedmousavi; Guillot; De Hoog (2013) em uma revisão sobre doenças fúngicas emergentes em animais relatam que as leveduras negras são capazes de infectar um grande espectro de invertebrados, incluindo artrópodes (principalmente crustáceos), moluscos e anelídeos. Os mesmos autores comentam que os insetos não são suscetíveis aos fungos negros e que doenças fatais podem ser observadas em insetos devido a outros agentes patogênicos, tais como *Beauveria* spp., *Cordiceps* spp., *Conidiobolus* spp., *Metarrhizium* sp. e *Hirsutella* spp.

Estima-se que mais de 100 espécies de fungos dematiáceos possam causar doenças, os quais podem se apresentar nos tecidos lesionados como células leveduriformes, pseudohifas, hifas verdadeiras ou qualquer combinação destas formas, sem a formação de corpos muriformes (MCGINNIS, 1992). Existem diversos relatos de casos de micoses provocados por fungos dematiáceos em pacientes imunodebilitados, tais como pacientes com AIDS (VICENTE, 2000).

Dentre as principais micoses causadas por este grupo destacam-se a cromoblastomicose e a feohifomicose, as quais podem permanecer nos locais de inoculação traumática, interiorizar-se ou disseminar-se (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006).

A cromoblastomicose é uma infecção micótica crônica, de evolução lenta, que acomete a pele e o tecido celular subcutâneo do homem e dos animais é também denominada cromomicose, dermatite verrucosa (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). Os agentes mais frequentes são *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophiala carrionii*. Outras espécies também têm sido associadas com as lesões de cromoblastomicose como *F. monophora* (HOOG *et al.*, 2000) *F. nubica*

(NAJAFZADEH *et al.*, 2009), *E. jeanselmei* e *E. spinifera* (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; VICENTE *et al.*, 2008) além de outros fungos tais como *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium funicola* e *Catenulostroma chromoblastomycosum* (MOMIN *et al.*, 2008).

A doença apresenta uma evolução lenta de lesões nódulo verrucosa nos tecidos, atingindo frequentemente membros inferiores, sendo que lesões nos membros superiores, nádegas e em outras regiões do corpo ocorrem com menos frequência (VICENTE, 2000; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). As lesões são secas, não provocam dor, não têm mau cheiro, devido a isso é muito comum casos de lavradores que apresentam a lesão por muitos anos (CALIGIORNE, 1999). O diagnóstico se dá pela observação células muriformes no exame micológico direto e/ou histopatológico; bem como pelo isolamento e a identificação na cultura (RIBEIRO, 2006; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009).

No tratamento da cromoblastomicose têm sido utilizadas diversas drogas como tiabendazol, anfotericina B e itraconazol. Atualmente, procedimentos clínicos também têm sido usados, como tratamento cirúrgico e crioterapia vêm sendo empregados com melhores perspectivas (MARTÍNEZ; TOVAR, 2007).

A feohifomicose abrange as micoses oportunistas causadas por fungos dematiáceos, que ocorrem desde as formas superficial, cutânea, subcutânea e até sistêmica, sem formação de corpos muriformes (REVANKAR *et al.*, 2002). Trata-se de uma infecção esporádica, cosmopolita, que acomete indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos; podendo acometer animais de outras espécies (SIDRIM, MOREIRA, 1999). Sua ocorrência se dá principalmente em regiões de clima tropical como Madagascar, norte da Venezuela, e região amazônica do Brasil, mas também há relatos da ocorrência de casos desta infecção na região sul do Brasil. (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006).

Os agentes etiológicos são principalmente os fungos pertencentes aos gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Wangiella*. Um grande número de casos tem sido diagnosticado somente em bases histopatológicas sem a identificação do agente pelo cultivo (REVANKAR *et al.*, 2002).

A forma subcutânea ocorre principalmente em países de clima tropical, subtropical e temperado, sendo *Exophiala jeanselmei* o agente mais frequente (KNOW-CHUNG; BENETT, 1992); porém Padhye *et al.* (1999) relataram um caso clínico de feohifomicose subcutânea causada por *Cladophialophora devrisei*.

Na doença sistêmica ou disseminada os órgãos internos podem ser invadidos por alguns agentes etiológicos desta doença. Algumas vezes a infecção acomete o cérebro sendo que as lesões podem ser isoladas ou múltiplas; e aparecem como abscessos encapsulados ou infiltrações inflamatórias generalizadas (FERREIRO *et al.*, 2007). Os agentes que acometem principalmente o sistema nervoso central são *Cladophiala bantiana* e *Ramichloridium mackenziei*.

O tratamento da feohifomicose tem sido realizado principalmente com o uso de terbinafina, itraconazol, anfotericina B, fluconazol e cetoconazol (SILVEIRA, 2001); associado ao tratamento cirúrgico que baseia-se na remoção cirúrgica dos tumores, mas podem ocorrer recidivas (SINGH *et al.*; 2006). O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e a combinação de terapias podem conter o sucesso para um melhor tratamento desta infecção no futuro (REVANKAR *et al.*, 2002).

### 3.4 HIDROCARBONETOS E DEGRADAÇÃO

Os hidrocarbonetos são encontrados no meio ambiente, onde se originam a partir de processos biogênicos e geológicos. Sua natureza química é diversificada, abrangendo formas simples, como alcanos e hidrocarbonetos monoaromáticos, bem como formas complexas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2006).

Os HPAs são compostos constituídos unicamente de átomos de carbono e de hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos (VERSCHUEREN, 2001), são pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis aromáticos da molécula (FERRAS, 2005).

Atualmente, há uma grande preocupação com a presença dos HPAs no ambiente, devido às suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Estes compostos são lipossolúveis e prontamente absorvidos no organismo de seres humanos e animais, onde reagem com o DNA e podem provocar câncer (CHAKRADEO *et al.*, 1993; NETTO *et al.*, 2000).

A degradação dos HPAs no ambiente pode ocorrer através de processos químicos e físicos. No entanto, estes processos são lentos e incompletos, sendo que



a biodegradação é a principal via de eliminação dos HAPs no solo (PRINCE; DRAKE, 1999).

Uma alternativa viável na descontaminação de locais impactados é a biorremediação, pois direciona o potencial fisiológico de micro-organismos na degradação enzimática dos hidrocarbonetos, devido à utilização destes compostos como fonte de carbono (RAHMAN *et al.*, 2003).

A utilização de fungos e bactérias isolados de locais impactados, visando aplicação em processos biotecnológicos, tem recebido destaque, sendo esses micro-organismos amplamente utilizados na remediação de poluentes e locais impactados (GOMES *et al.*, 2010).

Visando encontrar micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos e outros poluentes, muitos estudos vêm sendo realizados e dentre os micro-organismos destacam-se os fungos filamentosos, os quais têm demonstrado grande potencial em degradar tais compostos em ambientes terrestres (SATOW, 2008).

De modo geral, os fungos promovem degradação de compostos aromáticos basicamente de três modos: a) por reações de transformações parciais; b) mineralização do hidrocarboneto em presença de um segundo substrato; c) utilização do hidrocarboneto como única fonte de carbono para crescimento (PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2006).

Estudos mostram que vários gêneros de fungos são capazes de degradar compostos aromáticos como *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* (KATAOKA 2001, SATOW 2005) e alguns fungos de colônias negras (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005).

Várias espécies de leveduras negras têm sido isoladas de ambientes contaminados por hidrocarbonetos (DE HOOG, 2006). Essas leveduras são capazes de assimilar hidrocarbonetos monoaromáticos e de crescer em ambientes ricos nesses componentes (STERFLINGER, PRILLINGER, 2001; WOERTZ *et al.*, 2001; PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2002).

Prenafeta-Boldú *et al.* (2006) em uma revisão bibliográfica sobre sistemática, ecologia e metabolismo de linhagens fúngicas assimiladoras de hidrocarbonetos observaram que a maioria dos isolados pertenciam à ordem *Chaetothyriales*, gêneros *Cladophialophora* e *Exophiala*, ambas do grupo das leveduras negras.

Poluentes aromáticos podem ser metabolizados por vários fungos extremotolerantes do grupo de leveduras negras (GOSTINCAR, 2011). Estudos têm sugerido que pode haver ligações fisiológicas entre assimilação de hidrocarboneto aromático e certos padrões de infecção em mamíferos (PRENAFETA-BOLDU *et al.*, 2006). Muitas das linhagens que degradam hidrocarboneto volátil estão intimamente relacionadas com as espécies de fungos patogênicos humanos que podem causar graves micoses em pessoas imunocompetentes, especialmente infecções neurológicas (GOSTINCAR, 2011).

Gunsh *et al.*, 2005 estudou a degradação de etilbenzeno por *Exophiala lecanii-corni*. Os resultados do estudo sugerem que a enzima homogentisato dioxigenase pode também estar envolvida no metabolismo fúngico de compostos aromáticos. Estudos detalhados sobre o metabolismo de estireno por *Phialophora sessilis* e de tolueno por *Cladosporium sphaerospermum* revelaram a atividade de um complexo de enzimas P450 citocromo-monoxigenase e NADPH-reductase no ataque oxidativo a estes compostos (COX *et al.*, 1996; LUYKX *et al.*, 2003).

Prenafeta-Boldú e colaboradores (2002) estudaram a degradação de tolueno, etilbenzeno, xileno, por *Cladosporium* sp. e constataram a partir dos perfis metabólicos e da natureza inibitória das interações de substrato que os compostos foram degradados pela enzima monoxigenase.

### 3.5 FENOLOXIDASES

As fenoloxidasas são óxido-redutases que catalisam a oxidação de fenóis e possuem uma característica comum: a de serem capazes de oxidar compostos aromáticos, tendo como aceptor terminal de elétrons o oxigênio molecular (MAYER; STAPLES, 2002). Representam o maior grupo de enzimas envolvidas com a atividade do metabolismo secundário dos fungos filamentosos, e comumente estão associadas com a síntese de melaninas e outros pigmentos. As fenoloxidasas dividem-se em duas subclasses: lacases e tirosinases (DURAN; ESPOSITO, 2000).

### 3.5.1 Lacases

A enzima lacase foi descrita pela primeira vez por Yoshida em 1883 e caracterizada, em 1985, como uma oxidase contendo metal (MAYER; STAPLES, 2002). Do ponto de vista fisiológico, as lacases fúngicas estão envolvidas em processos de morfogênese, degradação de lignina, patogênese e formação de pigmentos (MOROZOVA *et al.*, 2007).

A lacase é uma fenoloxidase (p - difenol oxidase, EC 1.10.3.2) que catalisa a oxidação de várias substâncias aromáticas e inorgânicas (particularmente fenóis), com a redução de oxigênio para água. Oxida polifenóis, metoxi fenóis substituídos, diaminas e uma considerável série de outros substratos (THURSTON, 1994; MINUSSI *et al.*, 2002).

Como substratos sintéticos para lacases, é possível citar o ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) e a siringaldazina (4-Hidroxi-3,5-Dimetoxibenzaldeidazina). Embora lacases sejam boas oxidantes de difenóis, monofenóis como o 2,6-dimetoxifenol (1,3-dimetoxi-2-hidroxibenzeno) e o guaiacol (2-metoxifenol) são substratos sobre os quais a lacase também tem um bom poder de oxidação (ARORA e SHARMA, 2009).

Os principais micro-organismos produtores de lacase são os fungos da podridão branca da madeira, sendo que a espécie *Trametes versicolor* é um dos mais estudados fungos da podridão branca da madeira produtor de lacase (GARG; MODI, 1999).

Feng *et al.* (2012) e Sun *et al.* (2012) investigaram a atividade de lacase em leveduras negras dos gêneros *Fonsecaea*, *Cyphellophora* e *Phialophora* usando como substrato o ABTS. Os autores verificaram que todos os fungos testados apresentaram atividade da enzima e o substrato se mostrou eficaz.

Em um estudo de caracterização enzimática com endófitos negros dos gêneros *Microdochium* e *Periconia* realizado por Mandyam *et al.* (2010), investigou-se a produção de várias enzimas, dentre elas, a lacase. O substrato utilizado foi O-dianisidine e o mesmo se mostrou um bom substrato para detecção da enzima.

Lacases são enzimas com um grande interesse na indústria e têm sido extensivamente pesquisadas, devido suas propriedades que as tornam altamente úteis em diversos processos biotecnológicos (LIBARDI JUNIOR, 2010). Dentre as

várias aplicações desta enzima podemos destacar: a descoloração de corantes industriais, síntese de polímeros, biossensores amperométricos para detecção de fenol e também no processamento de alimentos e bebidas, remoção de xenobióticos em sistemas de águas, remoção de compostos fenólicos de vinhos, análises de drogas e produção de etanol (MAYER; STAPLES, 2002; MACIEL *et al.*, 2010).

Atualmente tem-se estudado a degradação de compostos xenobióticos como os pesticidas e efluentes domésticos e industriais por lacases fúngicas, uma vez que estas enzimas têm se mostrado muito eficazes em processos de biorremediação de poluentes ambientais. Sendo assim, a aplicação destas enzimas em processos de biorremediação torna-se uma alternativa muito eficaz na degradação destes compostos.

### 3.5.2 Tirosinase

As tirosinases são enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, estando presentes desde bactérias até os mamíferos (FENOLL *et al.*, 2001). Estão diretamente ligadas à melanogênese e são responsáveis pelos fenômenos de pigmentação em mamíferos e de escurecimento em cortes vegetais (VAN GELDERY *et al.*, 1997).

A tirosinase (E.C.1.14.18.1), também conhecida como catecolase, é uma enzima que catalisa a hidroxilação de monofenóis e a subsequente oxidação do o-difenol resultante em o-quinonas reativas (MAYER, 1987).

As tirosinases fúngicas são geralmente intracelulares (HALAOULI *et al.*, 2006) estando associadas ao escurecimento enzimático e à pigmentação. As melaninas da parede celular fúngica são derivadas da L-tirosina,  $\gamma$ -glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB) ou catecol, no caso de fungos basidiomicetos (BEEL; WHEELER, 1986).

As tirosinases fúngicas possuem grande importância nas indústrias farmacêuticas (síntese de fármacos o-difenólicos) e de alimentos (DURÁN *et al.*, 2002; HALAOULI *et al.*, 2006), também tem sido aplicadas na descoloração de corantes industriais, remoção de fenóis presentes em efluentes (CHIAACCHIERINI *et*

*al.*, 2004). Apesar das várias aplicações da tirosinase mais estudos acerca deste assunto precisam ser realizados (SEO *et al.*, 2003).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Neste trabalho foram estudadas 43 linhagens de leveduras negras de diferentes gêneros, de origem clínica, animal e ambiental isoladas de diferentes regiões fisiogeográficas do Brasil apresentadas na tabela 1. Além disso foram utilizadas como referência linhagens depositadas no Centro de Biodiversidade Fúngica (Centraalbureau voor Schimmelcultures)/ Holanda (TABELA 1).

TABELA 1- LINHAGENS ESTUDADAS

	Nome	Número de referência	Outros números	Substrato	Origem Geográfica	Genbank ITS
1	<i>Cladophialophora devriesii</i>	-	R45E1	Folha de árvore	Bahia, Brasil	KC445276
2	<i>Cladophialophora sp.</i>	-	R26A3	Galho	Bahia, Brasil	-
3	<i>Exophiala bergeri</i>	CBS126015	VM20D1	Folha da palmeira	Maranhão, Brasil	-
4	<i>Exophiala sp.</i>	CBS127899	R32E3	Galho	Bahia, Brasil	KC445259
5	<i>Exophiala spinifera</i>	CBS126730	R57D1	Folha de árvore	Bahia, Brasil	KC445287
6	<i>Exophiala spinifera</i>	-	R68C1	Galho	Bahia, Brasil	KC445291
7	<i>Exophiala spinifera</i>	CBS126012	VM17A1	Casca de coco de babaçu	Maranhão, Brasil	-
8	<i>Exophiala spinifera</i>	CBS126874	VM20E6	Casca de coco de babaçu	Maranhão, Brasil	-
9	<i>Exophiala spinifera</i>	-	R67D1	Folha em decomposição	Bahia, Brasil	KC445289
10	<i>Exophiala spinifera</i>	-	R68E1	Galho	Bahia, Brasil	KC445292
11	<i>Exophiala spinifera</i>	dH_21463	R68E2	Galho	Bahia, Brasil	KC445293
12	<i>Exophiala xenobiotica</i>	-	R57D3	Folha de árvore	Bahia, Brasil	KC445288
13	<i>Exophiala xenobiotica</i>	-	R57A4	Folha de árvore	Bahia, Brasil	KC445283
14	<i>Capronia coronata</i>	CBS 617.96	ATCC 56201	Madeira	Nova Zelandia	JF747040
15	<i>Exophiala lacus</i>	CBS 117497	dH 13711	Água de lago, 1 m de profundidade	Holanda	JF747110
16	<i>Exophiala mesophila</i>	CBS 402.95		Peça de chuveiro	Alemanha	JF747111

continua

TABELA 1 - LINHAGENS ESTUDADAS

continuação

Nome	Número de referência	Outros números	Substrato	Origem Geográfica	Genbank	
					ITS	
17 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 121497	dH 12260	Material de endoscopia bronquial (humano) IMD	França	JF747121	
18 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 109147	dH 11838, Matos T-20	Banheiro	Holanda	JF747114	
19 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 121508	dH 13400	Lesão no dedo (humano)	Estados Unidos	JF747117	
20 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 836.95	dH 16276	Piscina	Alemanha	JF747112	
21 <i>Exophiala alcalophila</i>	CBS 118722	ISO13	Solo	Brasil	JF747043	
22 <i>Exophiala alcalophila</i>	CBS 521.82	-	Solo	Japão	JF747042	
23 <i>Exophiala angulospora</i>	CBS 120272	dH 17395	Água de beber de torneira	Holanda	JF747045	
24 <i>Exophiala angulospora</i>	CBS 146.93	-	Madeira de tília	Alemanha	JF747053	
25 <i>Exophiala angulospora</i>	CBS 122264	dH 17026, Saunte 83	Lesão na perna (humano)	Dinamarca	JF747052	
26 <i>Exophiala halophila</i>	CBS 121512	dH 13757	Pele da axila (humano)	Estados Unidos	JF747108	
27 <i>Exophiala halophila</i>	CBS 121499	dH 12324	Lesão na unha (humano)	Alemanha	JF747109	
28 <i>Exophiala aquamarina</i>	CBS 120417	dH 17512	Dragão marinho folhado	Estados Unidos	JF747057	
29 <i>Exophiala aquamarina</i>	CBS 119921	dH 16412	Dragão marinho comum	Estados Unidos	JF747059	
30 <i>Exophiala brunnea</i>	CBS 587.66	ATCC 32288	<i>Acacia karroo</i>	África do Sul	JF747062	
31 <i>Exophiala cancerae</i>	CBS120420	dH 17409,	Caranguejo	Brasil	JF747064	
32 <i>Exophiala cancerae</i>	CBS 115142	CPC11044 DQ008139	Bebida de frutas	Desconhecido	JF747067	
33 <i>Exophiala cancerae</i>	CBS 117491	dH 13595	Água limpa de tanque	Holanda	JF747066	
34 <i>Exophiala opportunistica</i>	CBS 109811	dH 12243, IWW 720	Água de beber	Alemanha	JF747123	
35 <i>Exophiala opportunistica</i>	CBS 637.69	dH 16111	Álcool polivinílico	Holanda	JF747127	
36 <i>Exophiala opportunistica</i>	CBS 631.69	-	Desconhecido	Holanda	JF747128	
37 <i>Exophiala pisciphila</i>	CBS 121505	dH 13077	Piscina	Alemanha	JF747129	
38 <i>Exophiala pisciphila</i>	CBS 119913	dH 16407	Cavalo marinho de barriga	Estados Unidos	JF747132	
39 <i>Exophiala salmonis</i>	CBS 110371	dH 12699	Água de beber	Holanda	JF747139	
40 <i>Veronaea botryosa</i>	CBS 102593	-	Infecção disseminada em criança (humano)	China	JF747142	

continua

TABELA 1 - LINHAGENS ESTUDADAS

Nome	Número de referência	Outros números	Substrato	Origem Geográfica	conclusão	
					Genbank	ITS
<b>41</b> <i>Veronaea botryosa</i>	CBS 254.57		Resíduo de azeitona (sansa)	Itália	JF747143	
<b>42</b> <i>Veronaea botryosa</i>	CBS 121506	dH 1332	Lesão pele do pulso (humano)	Estados Unidos	JF747140	
<b>43</b> <i>Veronaea botryosa</i>	CBS 101462	dH 1373	Humano, pele	Filipinas	JF747141	

**1-13:** isolados ambientais; **14 – 24:** linhagens *Exophiala* nascidas da água; **21 – 43:** linhagens clado Salmonis.

FONTE: O AUTOR (2013)

## 4.2 REATIVAÇÃO DAS CULTURAS LIOFILIZADAS E MANUTENÇÃO

As linhagens cedidas pelo Instituto CBS, foram reativadas de acordo com as instruções fornecidas pelo instituto. As ampolas contendo as linhagens liofilizadas foram desinfetadas com algodão umedecido em com álcool 70%, flambadas e abertas na marcação indicada com o auxílio de uma serra dentro do fluxo laminar. O conteúdo do frasco previamente aberto foi transferido para um tubo esterilizado contendo 3 mL de água destilada esterilizada.

Após incubação de 4 horas em temperatura ambiente, 1 mL da suspensão foi transferida para placa de petri contendo Ágar Sabouraud e incubadas a 26°C até crescimento. Após crescimento as linhagens foram repicadas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud e Ágar Extrato de Malte (MEA 2%) inclinado e incubadas a 26°C. Após o crescimento, foi adicionado óleo mineral esterilizado sobre a cultura e estocadas a temperatura ambiente. E os repiques repetidos mensalmente. Os mesmo procedimentos foram adotados para as demais linhagens utilizadas neste estudo



#### 4.3 TESTE DE TOLERÂNCIA A TEMPERATURA

A tolerância à temperatura foi realizada conforme descrito por De Hoog *et al.* (2011). Os fungos foram cultivados sob aerobiose durante sete dias, a 26°C em Ágar Sabouraud e em seguida, cilindros de 2mm dos bordos da colônia foram cortados com auxílio de um vazador de rolha, e transferidos para placas contendo Ágar Extrato de Malte as quais possuíam um orifício central.

O monitoramento do crescimento das linhagens foi realizado a partir da medição do diâmetro médio das colônias com auxílio de uma régua, durante 21 dias. Para o cálculo do diâmetro médio do crescimento era realizado a subtração de 2mm referente ao inóculo inicial. As temperaturas de incubação foram de 21-36°C em intervalos de 3°C, e também a 37 e 40°C. Nos gráficos gerados a partir da média dos diâmetros do crescimento das linhagens nas diferentes temperaturas, adotou-se a cor azul claro para a apresentação dos resultados das linhagens do clado Salmonis, azul escuro para as linhagens de *Exophiala* nascidas da água e a cor verde para os isolados ambientais.

#### 4.4 TESTE DE TOLERÂNCIA AO PH

A tolerância ao pH foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Oliveira; Vendruscolo (2007). Os fungos foram cultivados durante 7 dias, a 26°C em Ágar Sabouraud e foram cortados cilindros de 2mm dos bordos da colônia com auxílio de um vazador de rolha, e transferidos para placas contendo Ágar Extrato de Malte com diferentes pH as quais possuíam um orifício central.

O monitoramento do crescimento das linhagens foi feito a partir da medição do diâmetro médio das colônias e realizada a subtração de 2mm referente ao inóculo inicial. Foram realizadas medições durante 21 dias. A faixa de pH testada foi de 2,5 a 9, em intervalos de 0,5. Da mesma forma que o adotado para os resultados de temperatura, os gráficos gerados a partir da média de crescimento das linhagens nos diferentes pH, adotou-se a cor azul claro para as linhagens do clado Salmonis,

azul escuro para as linhagens de *Exophiala* nascidas da água e a cor verde para os isolados ambientais.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A avaliação da produção enzimática foi realizada em placas de Petri contendo meios específicos para detecção da atividade enzimática. Os fungos foram cultivados durante 7 dias, a 26°C em Ágar Sabouraud e foram cortados cilindros de 2mm dos bordos da colônia com auxílio de um vazador de rolha, e transferidos para placas contendo os meios específicos para detecção das enzimas fenoloxidase e lacase.

Para a avaliação da atividade das enzimas fenoloxidases foi utilizado o meio descrito por Pointing (1999), contendo Ágar Extrato de Malte acrescido de ácido tânico 0,5%, considerou-se como resultado positivo a visualização de halos de cor marrom em torno da colônia ( figura 1). Para lacase utilizou-se o meio descrito por Viswanath *et al.* (2008) composto por guaiacol 0,2% e bagaço de cana 0,01%, após 14 dias verteu-se sobre a colônia uma solução de  $\alpha$  – Naftol a 0,01 M e considerou-se como resultado positivo a formação de coloração marrom no meio de cultura (FIGURA 2).

Nos gráficos gerados a partir da avaliação qualitativa da atividade das enzimas lacase e fenoloxidase, adotou-se a cor cinza escuro para positividade da enzima fenoloxidase e cinza claro para positividade da enzima lacase.

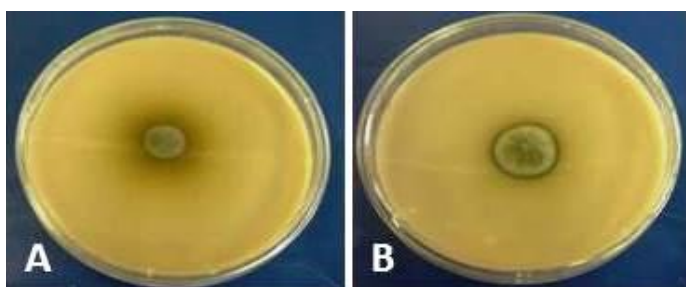


FIGURA 1 – PADRÃO DE POSITIVIDADE ADOTADO NO TESTE QUALITATIVO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FENOLOXIDASES DAS LINHAGENS ESTUDADAS.

A- Controle positivo caracterizado formação de Halos acastanhados. B controle negativo

FONTE: O AUTOR, (2013)

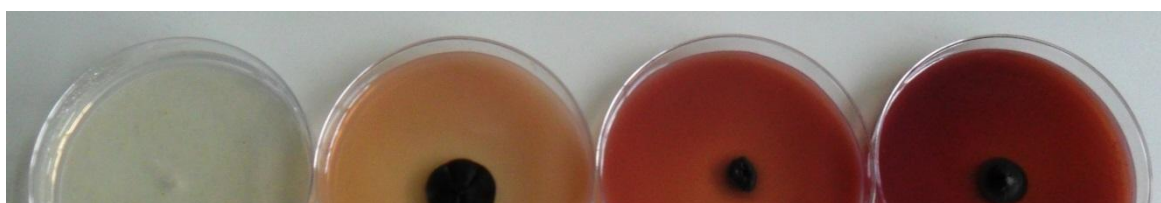


FIGURA 2 – PERFIL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – ENZIMA LACASE EM MEIO CONTENDO GUAIACOL COMO SUBSTRATO..

A – Controle, Meio de cultura sem inóculo; B – coloração indicativa de baixa atividade enzimática; C - coloração indicativa de atividade enzimática considerada média; D - coloração indicativa de elevada atividade enzimática.

FONTE: O AUTOR, (2013)

#### 4.6 TESTES DE ASSIMILAÇÃO DE ÓLEO MINERAL E CORANTE REMAZOL AZUL

O teste de assimilação de Óleo mineral e corante Remazol Azul foi adaptado a partir da metodologia descrita por Satow *et al.* (2008) e realizado a partir da assimilação destes compostos pelas linhagens selecionadas.

Para o teste foram estabelecidos 6 tratamentos: Tratamento A controle (Meio mínimo líquido com dextrose, sem adição de óleo mineral ou corante) Tratamento B controle (Meio mínimo líquido sem dextrose, sem adição de óleo mineral ou corante); Tratamento C (Meio mínimo líquido com dextrose, com 20% de óleo mineral) Tratamento D (Meio mínimo líquido sem dextrose, com 20% de óleo mineral); Tratamento E (Meio mínimo líquido com dextrose, com 0,01 g/L de Remazol Azul); Tratamento F (Meio mínimo líquido sem dextrose, com 0,01 g/L de Remazol Azul).

Os inóculos das linhagens selecionadas foram preparados a partir da suspensão de esporos em solução salina a 0,85% e a concentração padronizada com auxílio da câmara de Neubauer para que fosse equivalente a  $1,00 \times 10^6$  esporos/mL.

O teste foi realizado em placas de cultivo celular de 96 poços, de fundo chato, incubadas a 28°C, sob agitação constante de 120rpm. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placas nos tempos 0, 24, 96 e 168h. O experimento foi realizado em quadruplicata para cada linhagem avaliada. Foram

realizadas leituras de absorbância a 540nm para todos os tratamentos. A tabela 2 apresenta a composição dos meios em cada tratamento:

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA líquidos e as DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO utilizados para o TESTE DE ASSIMILAÇÃO DE ÓLEO MINERAL E CORANTE REMAZOL AZUL (VOLUMES  $\mu\text{L}$ ).

SOLUÇÃO	TRATAMENTOS					
	A	B	C	D	E	F
Inóculo ( $1,0 \times 10^6$ esporos/mL)	30	30	30	30	30	30
Meio mínimo com dextrose	-	270	-	210	-	210
Meio mínimo sem dextrose	270	-	210	-	210	-
Óleo mineral	-	-	60	60	-	-
Remazol Azul	-	-	-	-	60	60
Total	300	300	300	300	300	300

FONTE: Adaptado de Satow *et al.* (2008).

A assimilação do hidrocarboneto e degradação do corante foi verificada mediante comparação das curvas de crescimento com o controle e entre os diferentes tratamentos baseado nas condições estabelecidas por Satow, (2008).

Os valores das leituras de absorbância dos tratamentos controle (sem adição de suspensão de esporos) foram subtraídos dos obtidos para comparação das curvas de crescimento das linhagens em diferentes tratamentos. Assim, nos gráficos apresentados (FIGURAS 13 a 18), os valores de absorbância referem-se apenas ao crescimento da linhagem nos diferentes tratamentos.

O tratamento A contendo suspensão de esporos mais meio mínimo sem dextrose (MMSD) e o tratamento B contendo suspensão de esporos mais meio mínimo com dextrose (MMCD) foram utilizados como controle. As linhagens cujas curvas de crescimento nos demais tratamentos apresentaram valores superiores aos controles foram consideradas assimiladoras de hidrocarbonetos.

#### 4.7 DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL AO LONGO DO TEMPO

A metodologia usada para verificação da cinética de descoloração foi a descrita por Niebish (2009). Frascos contendo um volume de 5 mL de Meio mínimo sem dextrose e 0,1g/L de corante foram inoculados com 0,5 mL de solução de

esporos padronizados a  $1,00 \times 10^6$  esporos/mL e incubados a 28°C no escuro, sob agitação constante. O mesmo procedimento foi realizado utilizando meio mínimo com dextrose. Nos tempos 24h, 96 e 168h o sobrenadante foi coletado por centrifugação para análise espectrofotométrica a 600nm.

Os dados referentes à descoloração são dados em absorbância relativa, onde o controle sem inóculo apresenta absorbância de 100% e os valores das amostras foram calculados proporcionalmente a este. Quando a absorbância das amostras foi inferior a obtida no controle, esta redução de absorbância foi designada de atividade descorante.

#### 4.8 EXTRAÇÃO DNA

A metodologia utilizada foi estabelecida por Vicente *et al.* (2008). Aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de micélio, das linhagens de leveduras negras cultivadas em Ágar Sabouraud, foram transferidas para microtubos de PCR de volume 1,5mL contendo tampão CTAB e uma mistura de sílica em pó (sílica gel/celite 2:1). O material foi triturado e adicionado clorofórmio obtendo-se fases. À fase aquosa foi coletada e transferida para tubos esterilizados, acrescentado etanol para a precipitação do DNA. Após a precipitação do DNA, foi procedida a lavagem com álcool 70% gelado. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (260nm) e sua integridade verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio.

#### 4.9 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1, 5.8S e ITS2 DO rDNA.

Para a amplificação e sequenciamento da região ITS foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (Primers) descritos na tabela 3. As reações de amplificação (PCR) foram preparadas num volume de 25 µL contendo 16,5 µL de água ultrapura esterilizada, 2,5 µL de tampão de PCR 10 x, 2 µL de dNTPs (2,5

mM), 1 µL de cada um dos iniciadores (10 pmol), 0,5 µL de DNA polimerase (1 U / mL) e 1 µL do DNA extraído (50ng).

A amplificação foi realizada no termociclador ABI PRISM 2720 nas seguintes condições: 95°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 45 segundos, 52°C durante 30 segundos e 72°C durante 2 minutos, e 72°C durante 7 minutos.

Os produtos de amplificação por PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,4%, corado com brometo de etídio. Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com PEG 8000 (PEG 8000 30%, NaCl 1,6M). A reação de sequenciamento foi preparada num volume de 10 µL contendo 4 µL de água ultrapura esterilizada, 1µL dos iniciadores, 1 µL do produto de PCR purificado, 1µL de Big Dye (ddNTP) (Applied Biosystems), 3 µL de Buffer 5X (Applied Biosystems). A programação consistiu em: 96°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 10 segundos e 62°C durante 4 minutos, e extensão final de 72 ° C durante 7 minutos. As amostras foram purificadas com Sephadex G-50 Superfine e sequenciadas em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems).

TABELA 3 - LISTA DE OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES USADOS NAS REACOES DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA

LOCUS	PRIMER	SEQUENCIA 3' → 5'	REFERÊNCIAS
ITS	V9G <sup>1</sup>	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	De Hoog; Gerrits van den Ende (1998)
	LS266 <sup>1</sup>	GCATTCCCAAACAACCTCGACTC	Masclaux <i>et al.</i> (1995)
	ITS1 <sup>2</sup>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS4 <sup>2</sup>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS5 <sup>2</sup>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> (1990)

<sup>1</sup>Iniciadores utilizados para amplificação do fragmento da região ITS do rDNA.

<sup>2</sup>Iniciadores utilizados para sequenciamento da região ITS do rDNA

FONTE: O AUTOR (2013).

#### 4.10 ALINHAMENTO E ANÁLISE FILOGENETICA

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (STADEN, JUDGE, BONFIELD, 2001). As sequências obtidas foram comparadas com sequências existentes no banco de dados do

Instituto CBS permitindo a detecção de similaridade com sequências caracterizadas já existentes. Em seguida as sequências foram alinhadas usando o programa MAFFT (KATO, 2002) e inspecionadas visualmente pelo programa MEGA versão 5.1 (TAMURA *et al.*, 2011). A reconstrução filogenética e a obtenção da árvore foram realizadas pelo programa MEGA versão 5.1 (TAMURA *et al.*, 2011).

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos de tolerância a temperatura e pH, e de atividade enzimática foram realizados em triplicata, tanto para amostras quanto para controles. Os experimentos de assimilação de hidrocarbonetos e corante Remazol azul, e teste de descoloração do corante Remazol azul foram realizados com quadruplicata. Para os dados de temperatura e pH foi realizado apenas média e desvio padrão. Os dados de assimilação do óleo mineral e do corante Remazol azul, e descoloração do corante obtido foram analisados através do programa ASSISTAT Versão 7.6 beta – 2012 (SILVA; AZEVEDO, 2009) pela análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os detalhes dos cálculos realizados podem ser encontrados nos anexos.

## 5 RESULTADOS

Neste trabalho foi avaliado um total de 43 linhagens de espécies procedentes de diferentes regiões fisiogeográficas do mundo. Entre as espécies, 19 pertenciam a clado Salmonis (DE HOOG, 2011) das quais, quatro eram linhagens de *Veronaea botryosa* e 15 linhagens de diferentes espécies de *Exophiala*; e onze eram espécies de *Exophiala* de origem aquática, conhecidas como “*Exophialas* nascidas da água” (DE HOOG, 2011), e 13 isolados ambientais procedentes de diferentes regiões do Brasil (VICENTE et al, 2013; GUERRA et al., 2013).

Os isolados ambientais de *Exophiala* spp. e *Cladophialophora* spp. foram caracterizados por meio de sequenciamento da região ITS e comparados com linhagens de referência do Instituto CBS. A árvore foi gerada com Máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição de Kimura 2 parâmetros (FIGURA 3). Um total de 652 sítios foi avaliado. Destes, 316 pertenciam a sítios conservados, 312 sítios variáveis, 241 sítios parcimoniosos informativos (Pi) e 72 sítios únicos. A linhagem referência de *Phaeococcomyces catenatus* foi utilizada como grupo externo (DE HOOG et al., 2011). De acordo com a árvore gerada (FIGURA 3), os isolados, identificados por macro e micromorfologia como *Exophiala* spp., obtidos a partir do ambiente formaram vários agrupamentos. Os isolados relacionados com a espécie *E. spinifera* e *E. xenobiotica* foram reunidos no clado A, nominado como “clado spinifera” e clado B que reuniu todas as linhagens de *E. xenobiotica*, respectivamente. O isolado ambiental identificado como *Exophiala* sp. (R32E3) formou um grupo a parte (clado E), completamente separado dos outros grupos taxonômicos anteriormente descritos e relacionados às espécies *E. alcalophila* e *E. halophila* pertencentes a grande clade denominada de “*Exophialas* nascidas na água”. O isolado VM20D1 procedente da região amazônica, estado do Maranhão, foi identificado por meio de seqüências ITS como *E. bergeri* (clado F). Além disso, os isolados ambientais procedentes de ambiente aquático (mangue), identificados como *Cladophialophora* sp (R26A3) e *C. devriseii* (R45E1) respectivamente, foram reunidos dentro do clado C.



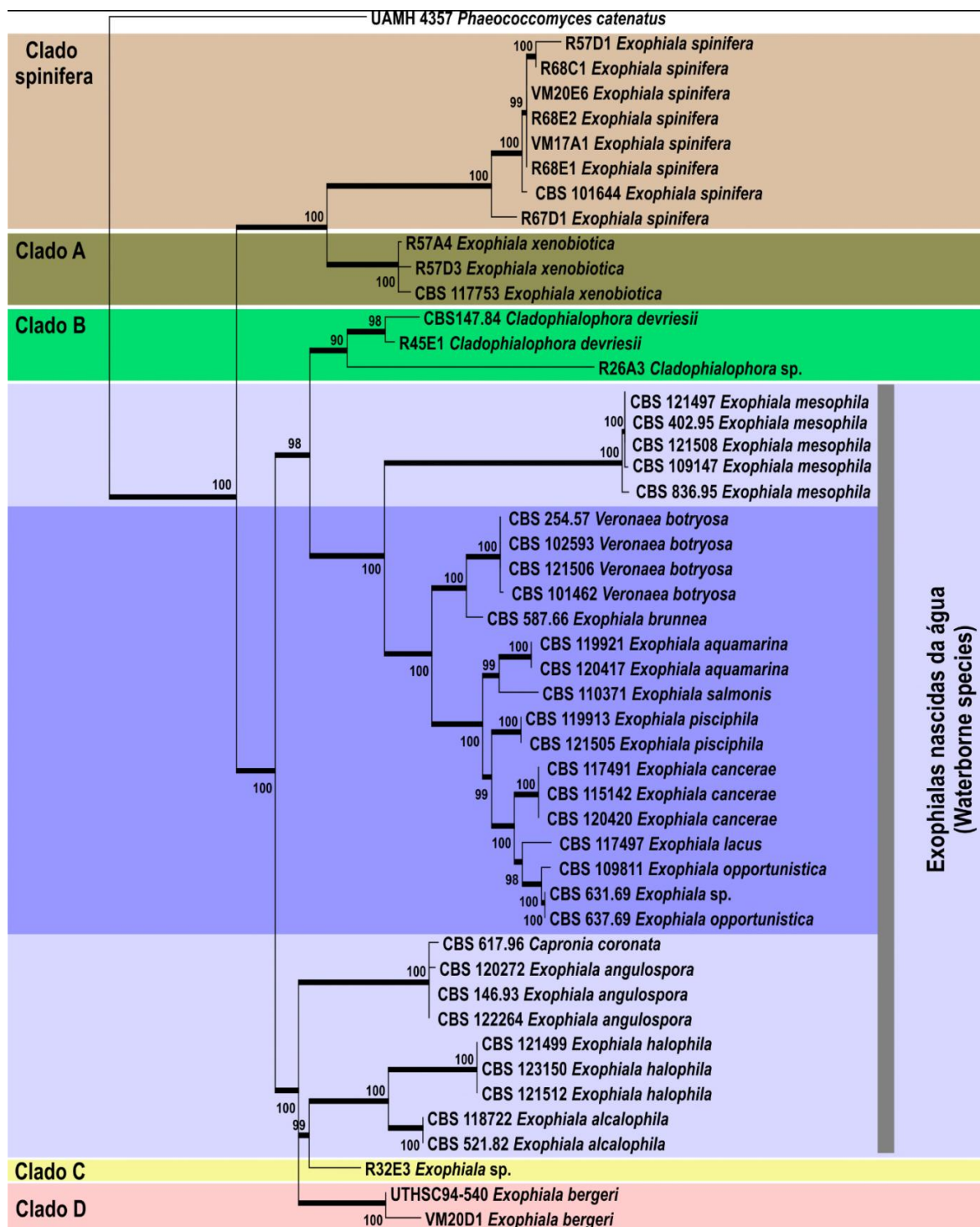


FIGURA 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Exophiala* e *Cladophialophora* BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA. A LINHAGEM REFERÊNCIA DE *Phaeococcomyces catenatus* FOI UTILIZADA COMO GRUPO EXTERNO. O SUPORTE DE BOOTSTRAP FOI CALCULADO A PARTIR DE 100 REPETIÇÕES; VALORES  $\geq 35$  A 100 SÃO MOSTRADOS ACIMA E ABAIXO DOS RAMOS; RAMOS APOIADOS ESTÃO EM NEGRITO.

FONTE: O AUTOR, (2013)

As temperaturas de crescimento de espécies do clado Salmonis (TABELA 1, FIGURA 3) foram determinadas num intervalo de 15 a 40°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento variou entre 24 e 27°C e a temperatura máxima de crescimento foi de 36°C para *Veronea botryosa*, e para as espécies de *Exophiala* entre 30 e 33°C. Os resultados do crescimento das linhagens do clado Salmonis nas diferentes temperaturas testadas foram apresentados no gráfico 1.

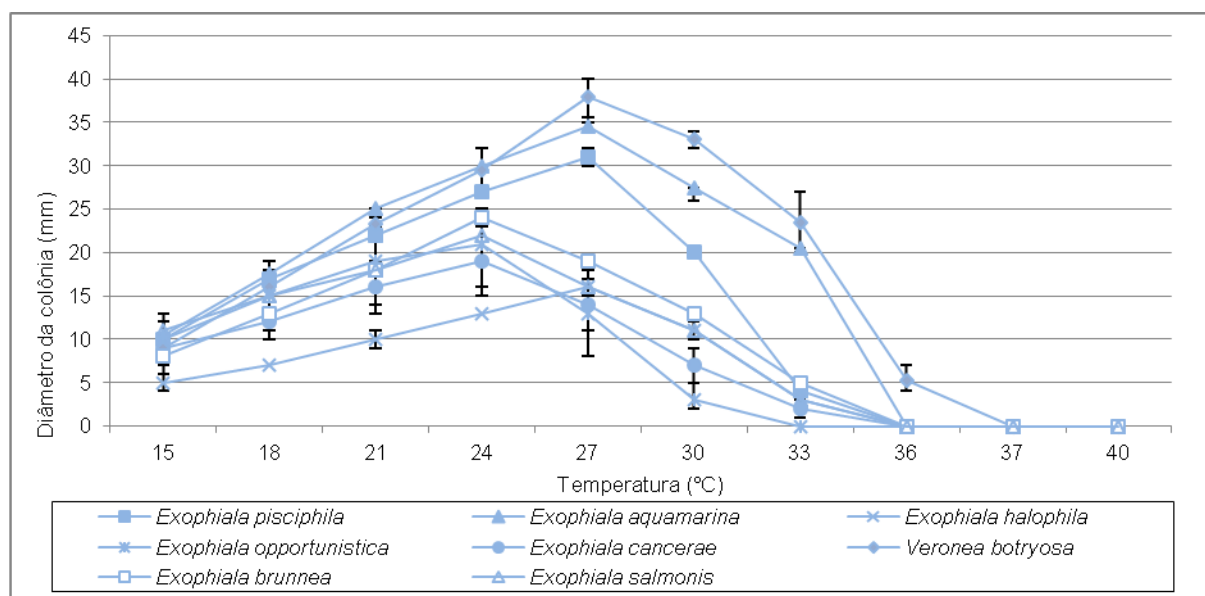


GRÁFICO 1 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2% DAS LINHAGENS DO CLADO SALMONIS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

\* Média de crescimento de diferentes linhagens: *E. aquamarina* (CBS120417; CBS119921), *E. brunnea* (CBS 587.66), *E. cancerae* (CBS120420; CBS 115142; CBS 117491), *E. halophila* (CBS 121512; CBS 121499), *E. opportunistica* (CBS 109811; CBS 637.69; CBS 631.69), *E. pisciphila* (CBS121505; CBS119913), *E. salmonis* (CBS 110371), *Veronea botryosa* (CBS 102593; CBS 254.57; CBS121506; CBS101462).

As espécies de *Exophiala* nascidas da água, *E. angulospora*, *E. alcalophila*, *E. mesophila*, *E. lacus* e *C. coronata* tiveram seu crescimento ótimo entre 24 e 27°C, sendo que *C. coronata* apresentou crescimento máximo a 36°C e *E. angulospora* apresentou crescimento a 40°C (GRÁFICO 2).

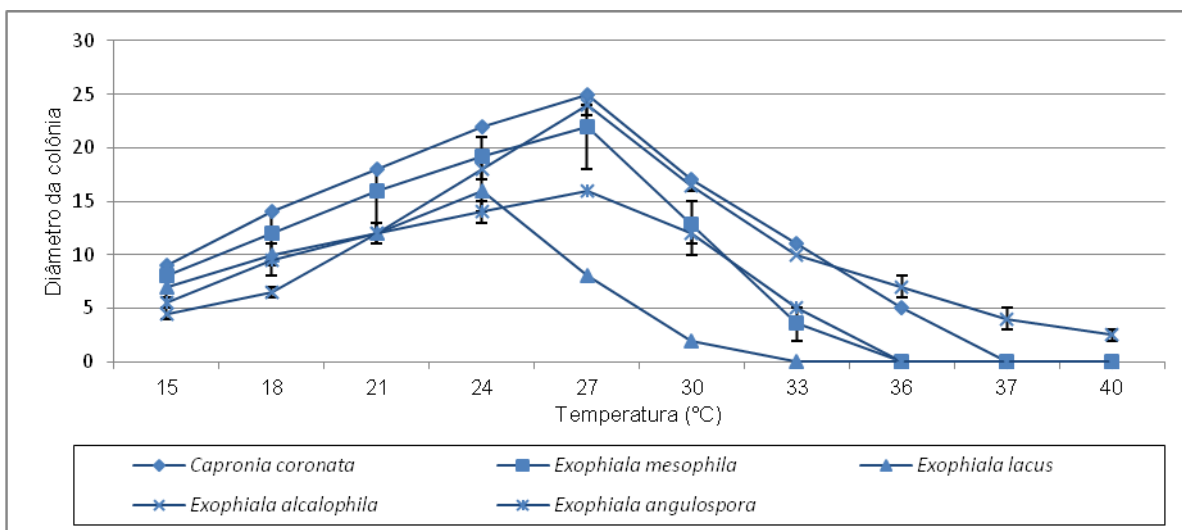


GRÁFICO 2 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2% DAS LINHAGENS DE *Exophiala* NASCIDAS DA ÁGUA EM DIFERENTES TEMPERATURAS, EM MEA 2%.

\*Média de crescimento de diferentes linhagens: *C. coronata* (CBS 617.96), *E. lacus* (CBS 117497), *E. mesophila* (CBS 402.95; CBS 121497; CBS 109497; CBS 121508; CBS 836.95), *E. alcalophila* (CBS 118722; 521.82) *E. angulospora* (CBS 120272; CBS146.93; CBS122264)

Os isolados de *E. spinifera* apresentaram um crescimento máximo de 40°C, com crescimento ótimo a 30°C, enquanto que os isolados de *E. xenobiotica* apresentaram crescimento ótimo a 30°C e máximo a 36°C e a espécie *E. bergeri* apresentou crescimento ótimo a 27°C e máximo a 36°C. Em relação aos isolados de *Cladophialophora* foi observado um crescimento ótimo a 33°C e o máximo a 40°C. Os resultados do crescimento dos isolados ambientais nas diferentes temperaturas testadas foram apresentados no gráfico 3.

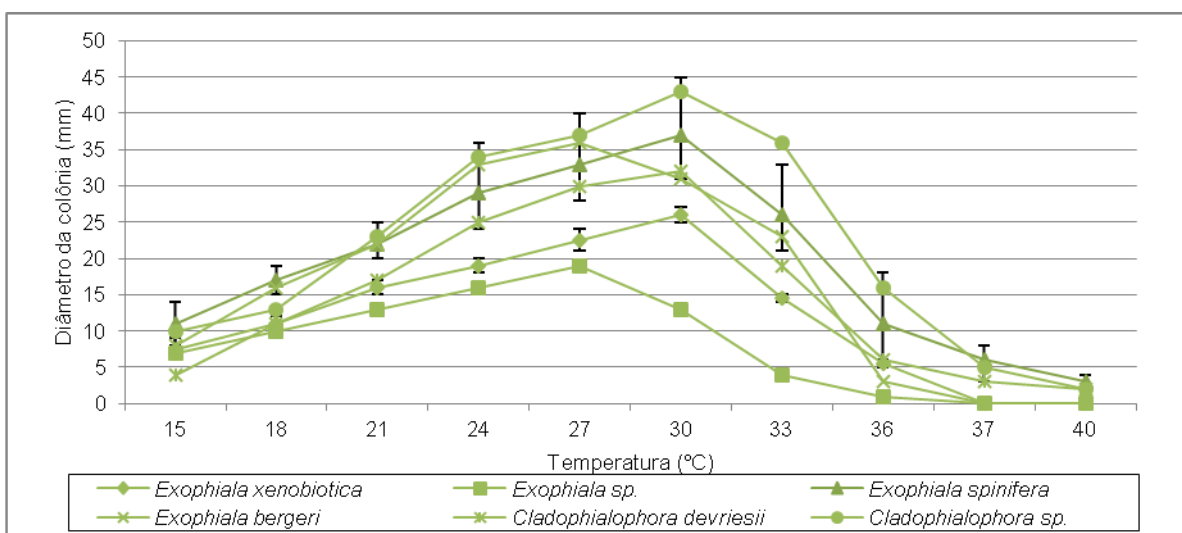


GRÁFICO 3 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM AGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2% DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Exophiala* EM DIFERENTES TEMPERATURAS,

\* Média de crescimento de diferentes linhagens: *E. bergeri* (CBS 1269015); *C. devriesii* (R45E1), *Exophiala* sp. (CBS127899), *E. spinifera* (CBS 126012; CBS 126874; R67D1; R68E1; dH\_21463; *E. xenobiotica* (R57D3; R57A4).

No gráfico 4, foi mostrado às medias das temperaturas ótimas de crescimento das linhagens estudadas.

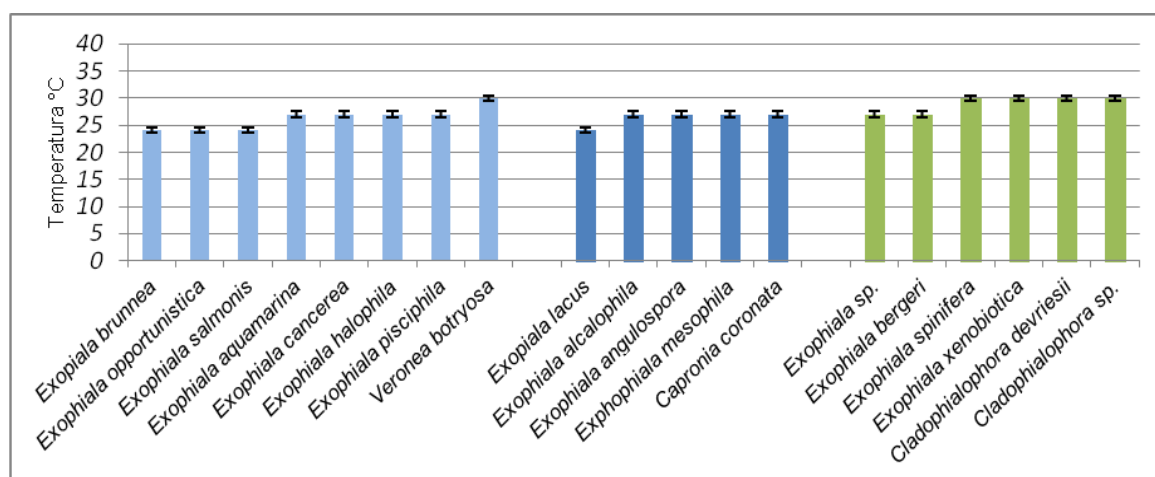


GRÁFICO 4 - MÉDIA DA TEMPERATURA ÓTIMA DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS.

\*Azul claro - linhagens do clado Salmonis; azul escuro - linhagens de *Exophiala* nascidas da água; verde - isolados ambientais.

Todas as linhagens apresentaram crescimento na faixa de pH entre 2,5 a 9. As espécies pertencente ao clado Salmonis (FIGURA 3) apresentaram crescimento ótimo variando entre os pH 4,5 e 5,5 (GRÁFICO 5 e 6), sendo que o mesmo resultado foi observado para as espécies de *Exophiala* nascidas da água (GRÁFICOS 5 e 7). No gráfico 5, pode-se verificar as médias de pH ótimo encontrado para as linhagens estudadas.

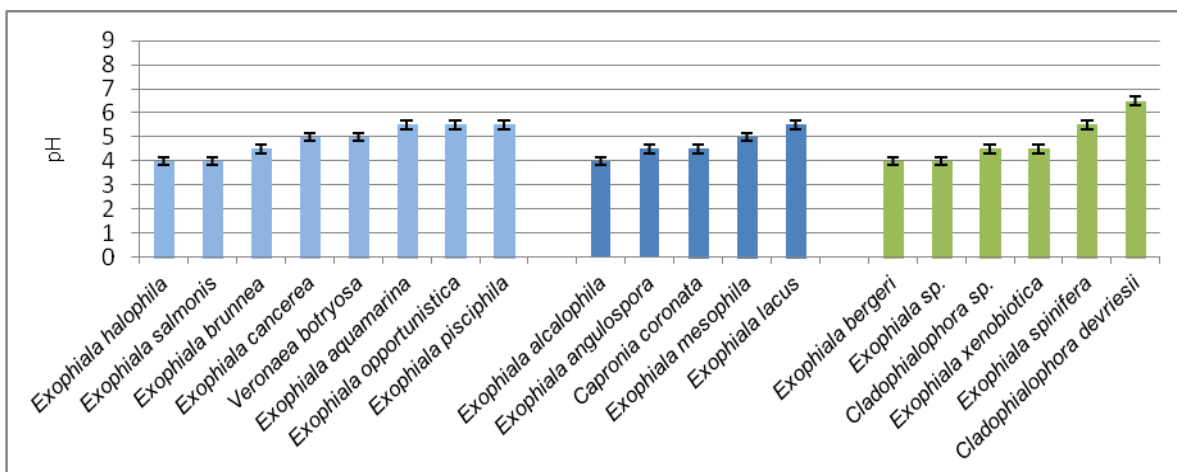


GRÁFICO 5 - MÉDIA DO PH ÓTIMO DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS.

\*Azul claro - linhagens do clado Salmonis; azul escuro - linhagens de *Exophiala* nascidas da água; verde - isolados ambientais.

No gráfico 6, pode-se verificar os resultados do crescimento das linhagens do clado Salmonis nos diferentes pH testados.

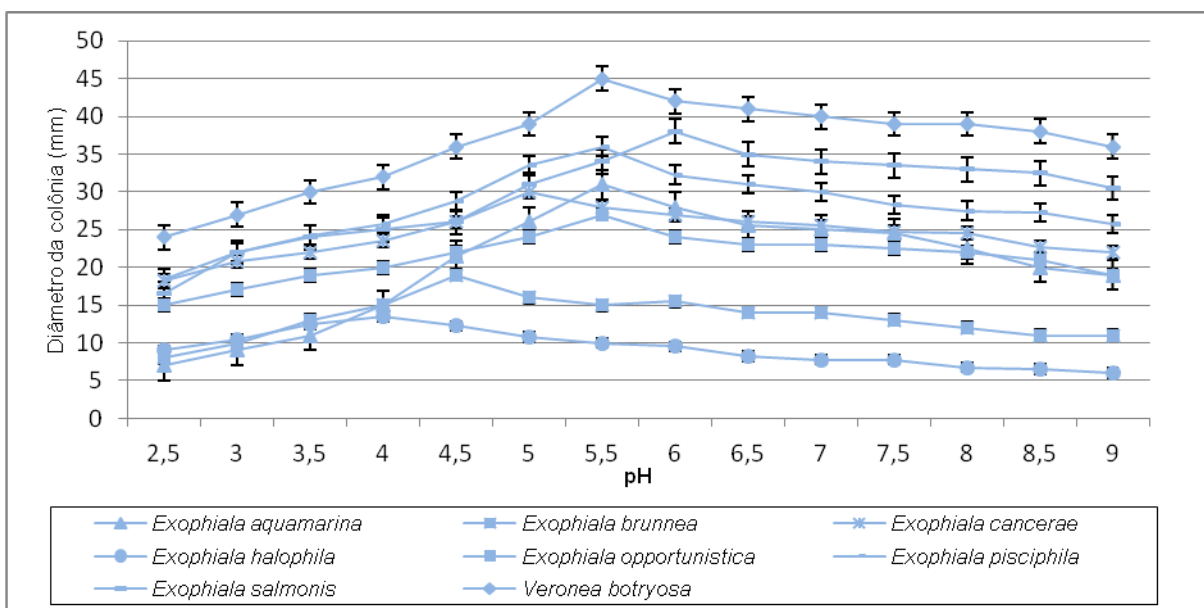


GRÁFICO 6 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE, DAS ESPÉCIES DO CLADO SALMONIS EM DIFERENTES PH.

\* Média de crescimento de diferentes linhagens: *E. aquamarina* (CBS120417; CBS119921), *E. brunnea* (CBS 587.66), *E. cancerae* (CBS120420; CBS 115142; CBS 117491), *E. halophila* (CBS 121512; CBS 121499), *E. opportunistica* (CBS 109811; CBS 637.69; CBS 631.69), *E. pisciphila* (CBS121505; CBS119913), *E. salmonis* (CBS 110371), *Veronea botryosa* (CBS 102593; CBS 254.57; CBS121506; CBS101462)

No gráfico 7, foi apresentado o crescimento das linhagens de *Exophiala* spp. nascidas da água nos diferentes pH testados.

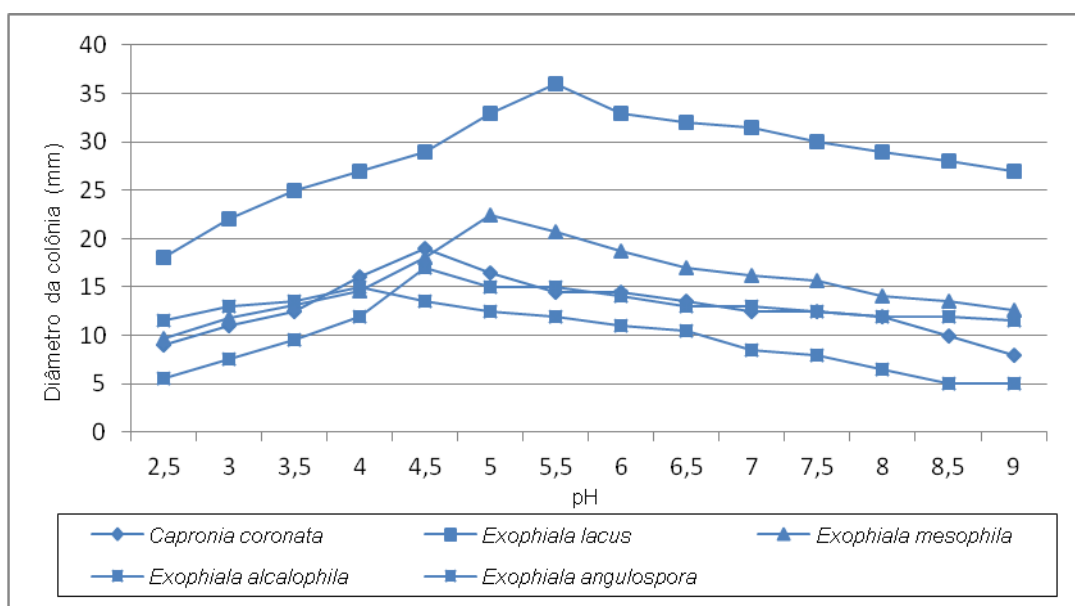


GRÁFICO 7 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2% DAS LINHAGENS DE *Exophiala* NASCIDAS DA ÁGUA EM DIFERENTES PH.

\* Média de crescimento de diferentes linhagens: *C. coronata* (CBS 617.96), *E. lacus* (CBS 117497), *E. mesophila* (CBS 402.95; CBS 121497; CBS 109497; CBS 121508; CBS 836.95), *E. alcalophila* (CBS 118722; 521.82) *E. angulospora* (CBS 120272; CBS146.93; CBS122264)

Para os isolados ambientais o pH ótimo de crescimento variou entre 4 e 6,5. De acordo com o diâmetro médio das colônias, o pH 6,5 foi considerado o ideal para a linhagem de *Cladophialophora devriesii* (GRÁFICO 5 e 8). As linhagens de *Exophiala* tiveram seu pH ótimo crescimento variando entre 4 e 5,5; e pode ser observado no gráfico 8, que apresenta o crescimento dos isolados ambientais nos diferentes pH testados.

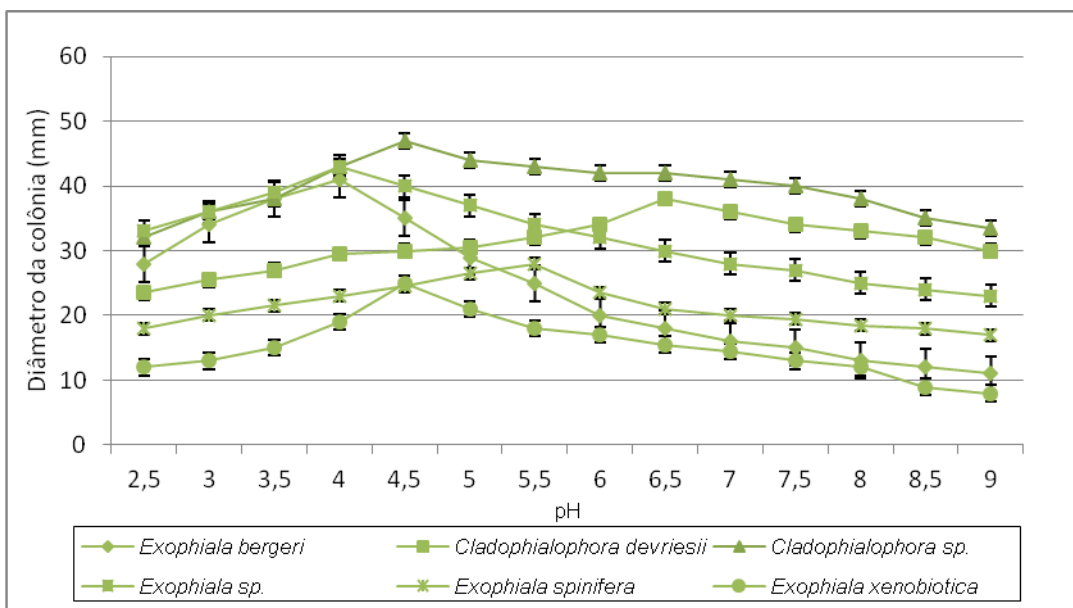


GRÁFICO 8 - CRESCIMENTO RADIAL (DIÂMETRO MÉDIO) EM MEIO ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA) 2% DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Exophiala* E *Cladophialophora*, EM DIFERENTES PH.

\* Média de crescimento de diferentes linhagens: *E. bergeri* (CBS 1269015); *C. devriesii* (R45E1), *Exophiala sp.* (CBS127899), *E. spinifera* (CBS 126012; CBS 126874; R67D1; R68E1; dH\_21463; *E. xenobiotica* (R57D3; R57A4).

A atividade enzimática para fenoloxidase e lacase foi testada para todas as espécies. Em relação à atividade fenoloxidase apenas seis linhagens das espécies *C. devriesii* (R45E1), *E. bergeri* (CBS 1269015), *Exophiala sp.* (CBS127899), *E. spinifera* (R67D1), *E. xenobiotica* (R57A4) se mostraram positivas para produção da enzima (TABELA 4, GRÁFICO 9 e 10). Todas as linhagens testadas apresentaram atividade para lacase, porém a intensidade da oxidação variou entre as espécies (TABELA 4, GRÁFICO 9 e 10).



TABELA 4 - AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FENOLOXIDASE E LACASE

Nome	Número de referência	Fenoloxidase	Lacase
1 <i>Cladophialophora devriesii</i>	R45E1	+	+++
2 <i>Cladophialophora sp.</i>	R26A3	-	++
3 <i>Exophiala bergeri</i>	CBS126015/ VM20D1	+	+++
4 <i>Exophiala sp.</i>	R32E3	+	++
5 <i>Exophiala spinifera</i>	CBS126730/ R57D1	-	++
6 <i>Exophiala spinifera</i>	R68C1	-	++
7 <i>Exophiala spinifera</i>	CBS126012/ VM17A1	-	+
8 <i>Exophiala spinifera</i>	CBS126874/ VM20E6	-	+
9 <i>Exophiala spinifera</i>	R67D1	+	+++
10 <i>Exophiala spinifera</i>	R68E1	-	++
11 <i>Exophiala spinifera</i>	dH_21463/ R68E2	-	+
12 <i>Exophiala xenobiotica</i>	R57D3	-	+++
13 <i>Exophiala xenobiotica</i>	R57A4	+	+++
14 <i>Capronia Coronata</i>	CBS 617.96	-	+
15 <i>Exophiala alcalophila</i>	CBS 118722	-	+++
16 <i>Exophiala alcalophila</i>	CBS 521.82	-	++
17 <i>Exophiala angulospora</i>	CBS 120272	-	++
18 <i>Exophiala angulospora</i>	CBS 146.93	+	++
19 <i>Exophiala angulospora</i>	CBS 122264	-	+++
20 <i>Exophiala aquamarina</i>	CBS 120417	-	++
21 <i>Exophiala aquamarina</i>	CBS 119921	-	+++
22 <i>Exophiala brunnea</i>	CBS 587.66	-	++
23 <i>Exophiala cancerae</i>	CBS 115142	-	++
24 <i>Exophiala cancerae</i>	CBS 117491	-	+
25 <i>Exophiala cancerae</i>	CBS120420	-	++
26 <i>Exophiala halophila</i>	CBS 121512	-	++
27 <i>Exophiala halophila</i>	CBS 121499	-	++
28 <i>Exophiala lacus</i>	CBS 117497	-	++
29 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 402.95	-	++
30 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 121497	-	+++
31 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 109147	-	++
32 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 121508	-	++
33 <i>Exophiala mesophila</i>	CBS 836.95	-	+
34 <i>Exophiala opportunistica</i>	CBS 109811	-	+++
35 <i>Exophiala opportunistica</i>	CBS 637.69	-	+++
36 <i>Exophiala opportunistica</i>	CBS 631.69	-	++
37 <i>Exophiala pisciphila</i>	CBS 121505	-	+++
38 <i>Exophiala pisciphila</i>	CBS 119913	-	++
39 <i>Exophiala salmonis</i>	CBS 110371	-	+++
40 <i>Veronaea botryosa</i>	CBS 102593	-	++
41 <i>Veronaea botryosa</i>	CBS 254.57	-	++
42 <i>Veronaea botryosa</i>	CBS 121506	-	+
43 <i>Veronaea botryosa</i>	CBS 101462	-	++

FENOLOXIDASE: - não apresentou reação positiva para produção da enzima. + apresentou reação positiva para produção da enzima. LACASE: + baixa atividade enzimática; ++ média atividade enzimática; +++ elevada atividade enzimática.



Os dados referentes à atividade das enzimas fenoloxidase e lacase, apresentados na tabela 4, também podem ser visualizados nos gráficos 9 e 10.

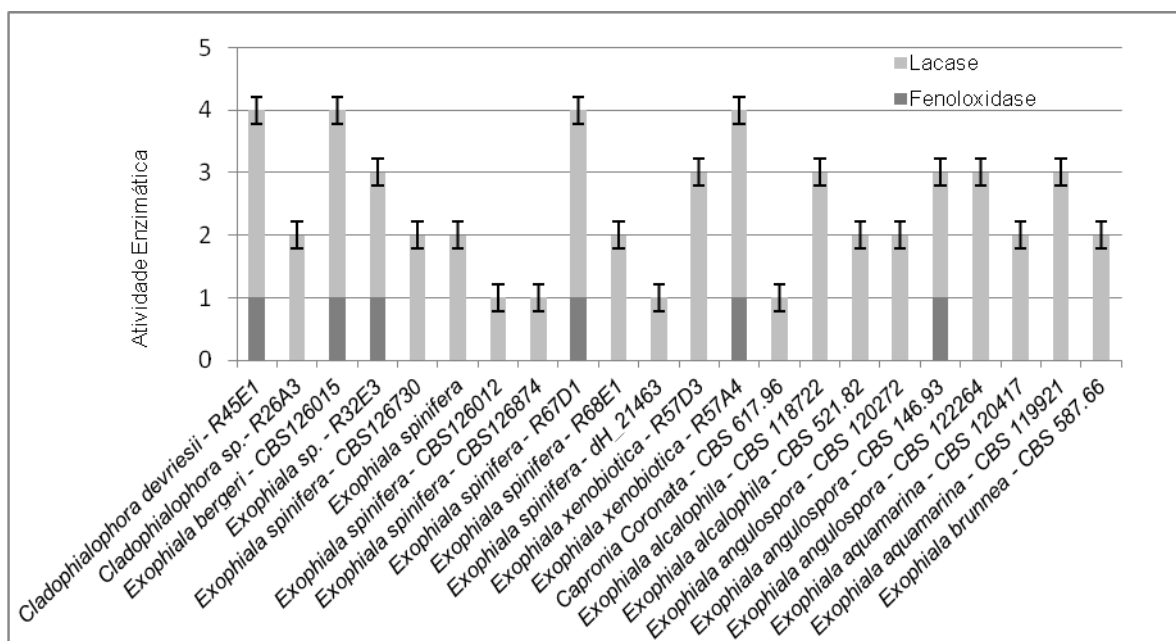


GRÁFICO 9 - AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FENOLOXIDASE E LACASE, DAS LINHAGENS REFERENCIAS E ISOLADOS AMBIENTAIS ESTUDADOS.

Fenoloxidase – 0 – não apresentou reação positiva para produção da enzima 1 – apresentou reação positiva para produção da enzima. Lacase – 1 – baixa atividade enzimática; 2 – média atividade enzimática; 3 – elevada atividade enzimática.

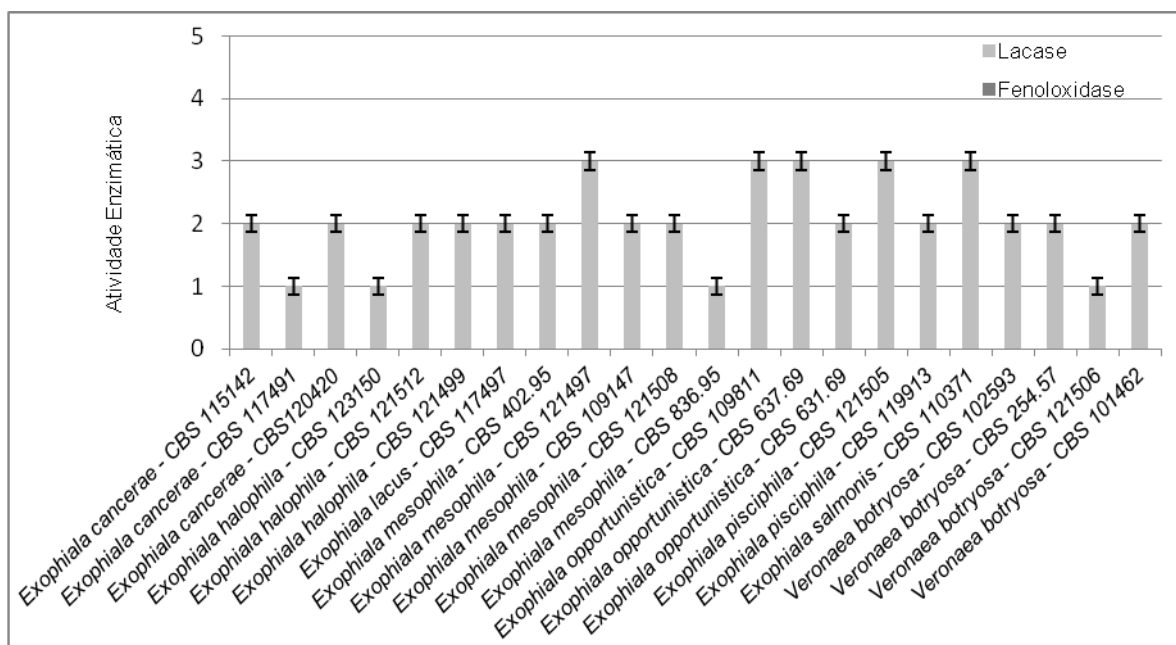


GRÁFICO 10 - AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FENOLOXIDASE E LACASE DAS LINHAGENS REFERENCIAS E ISOLADOS AMBIENTAIS ESTUDADOS.

\*Fenoloxidase – 0 – não apresentou reação positiva para produção da enzima 1 – apresentou reação positiva para produção da enzima. Lacase – 1 – baixa atividade enzimática; 2 – média atividade enzimática; 3 – elevada atividade enzimática.

As linhagens selecionadas para os testes de assimilação de óleo mineral e corante Remazol Azul, foram às linhagens de *Exophiala xenobiotica* (2), *E. bergeri* e *E. spinifera*. A escolha destes quatro isolados ambientais baseou-se nos resultados de temperatura, pH e produção enzimática. A linhagem de *E. spinifera* foi selecionada para realizar-se um comparativo com as demais linhagens, pois trata-se uma linhagem que é reconhecidamente causadora de infecção em humanos.

As quatro linhagens de origem ambiental testadas na assimilação de óleo mineral e corante Remazol Azul foram capazes de crescer na presença destes compostos tanto na presença quanto na ausência de uma fonte de carbono (dextrose), mas observou-se melhor crescimento de todas as linhagens na presença de uma fonte de carbono (GRÁFICO 12, 14 e 16).

A adição de óleo mineral e corante Remazol azul numa fração correspondente a 20% do volume total, estimulou o crescimento das linhagens de *E. xenobiotica* e *E. spinifera* (GRAFICO 12 e 13).

Os resultados da curva de crescimentos dos isolados ambientais no tratamento controle sem fonte de carbono (dextrose) foram apresentados no gráfico 11.

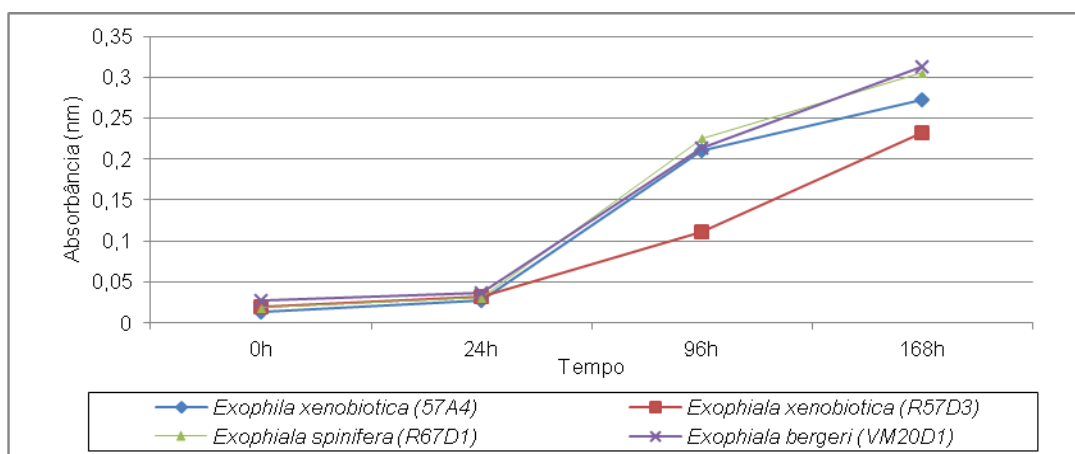


GRÁFICO 11 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Exophiala* EM MEIO MÍNIMO SEM DEXTROSE (TRATAMENTO A), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C SOB AGITAÇÃO A 120 RPM.

No gráfico 12, foi apresentado a curva de crescimentos dos isolados ambientais em presença de 20% de óleo mineral.

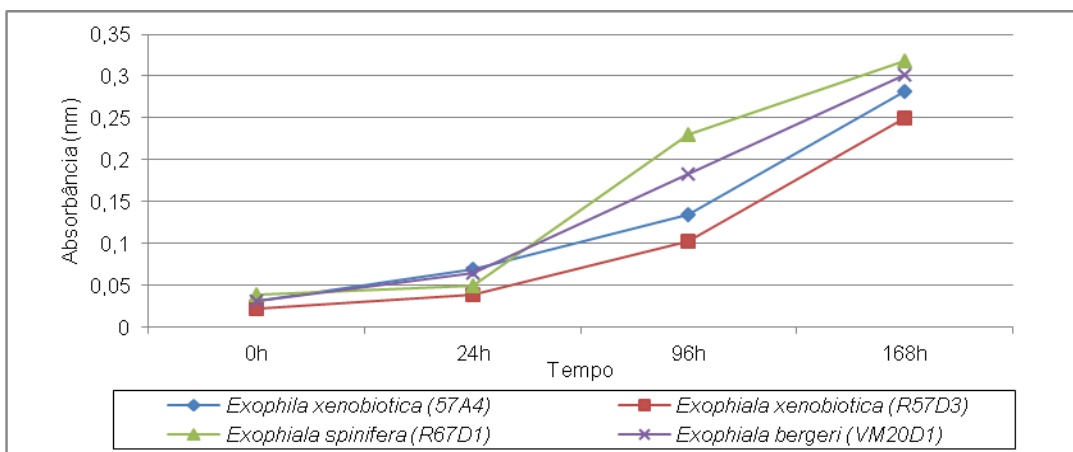


GRÁFICO 12 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Exophiala* EM MEIO MÍNIMO SEM DEXTROSE E ÓLEO MINERAL (TRATAMENTO C), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM.

A curva de crescimento dos isolados ambientais em presença de 20% do corante Remazol Azul foi apresentada no gráfico 13.

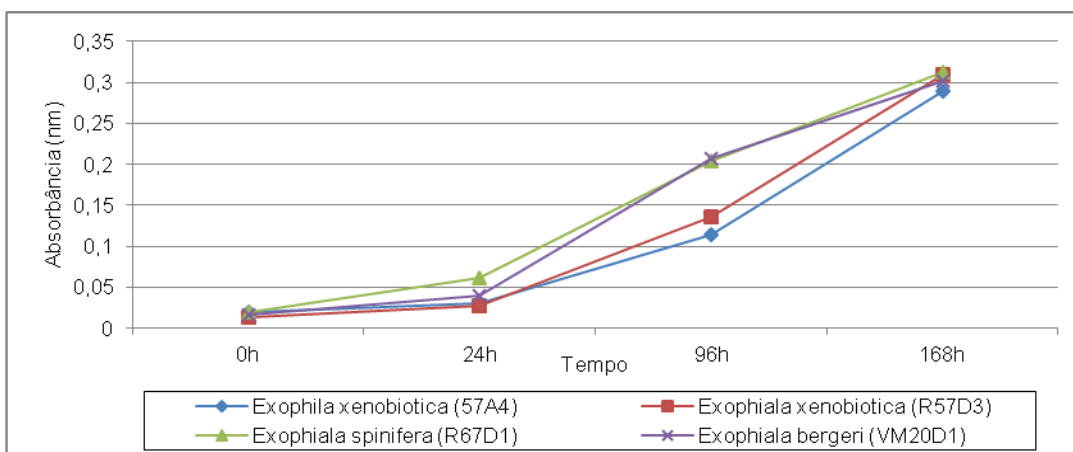


GRÁFICO 13 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Exophiala* EM MEIO MÍNIMO SEM DEXTROSE E CORANTE REMAZOL AZUL (TRATAMENTO E), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM.

O isolado VM20D1 de *E. bergeri* apresentou crescimento semelhante nos três tratamentos sem adição de dextrose (GRÁFICO 11, 12 e 13), indicando que a presença de óleo mineral ou do corante na proporção de 20% não interferiu no crescimento deste organismo. Sendo assim, este isolado pode ser considerado tolerante a ambientes com hidrocarbonetos e corantes, porém incapaz de assimilá-los como única fonte de carbono. Além disso, foi possível observar que a espécie *E. bergeri* necessita de uma fonte de carbono para que consiga assimilar os compostos

testados (GRÁFICO 13 e 15). Em relação aos isolados de *E. xenobiotica*, observou-se que os dois isolados estudados (R57A4 e R57D3) tiveram maior taxa de crescimento em Remazol azul, enquanto que o isolado R67D1 de *E. spinifera* teve maior taxa de crescimento na presença de óleo mineral. No gráfico 14, pode-se observar a curva de crescimento dos isolados ambientais testados na presença de uma fonte de carbono.

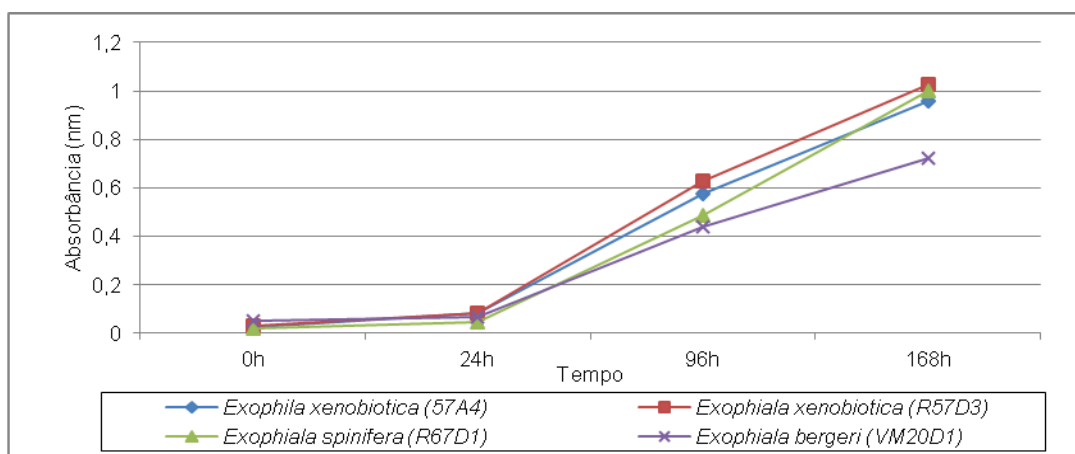


GRÁFICO 14 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Exophiala* EM MEIO MÍNIMO COM DEXTROSE (TRATAMENTO B), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM

No gráfico 15 foi apresentado a curva de crescimento dos isolados ambientais de *E. xenobiotica*, *E. bergeri* e *E spinifera* cultivados em meio mínimos contendo óleo mineral a 20%.

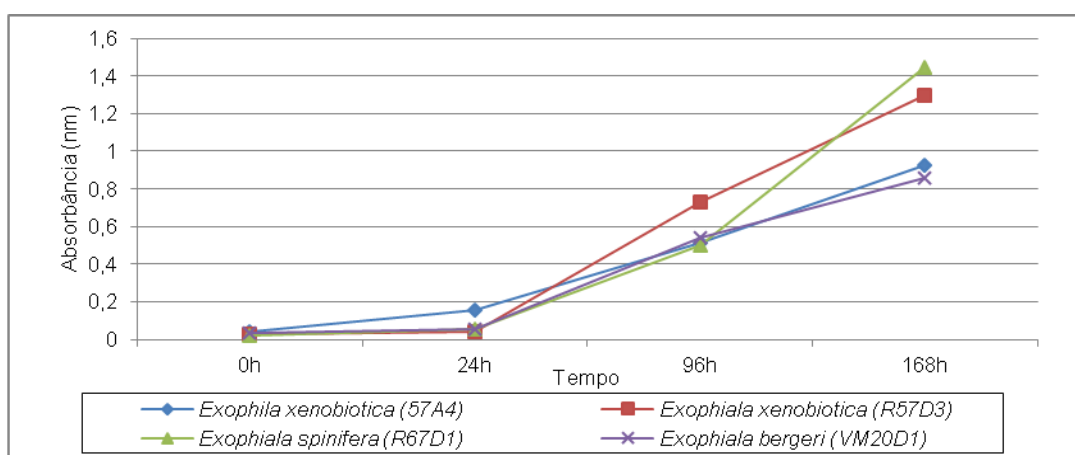


GRÁFICO 15 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Exophiala* EM MEIO MÍNIMO COM DEXTROSE E ÓLEO MINERAL (TRATAMENTO D), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM.

A curva de crescimento dos isolados ambientais de *Exophiala* testados na presença de Remazol Azul em 20% foi apresentada no gráfico 16.

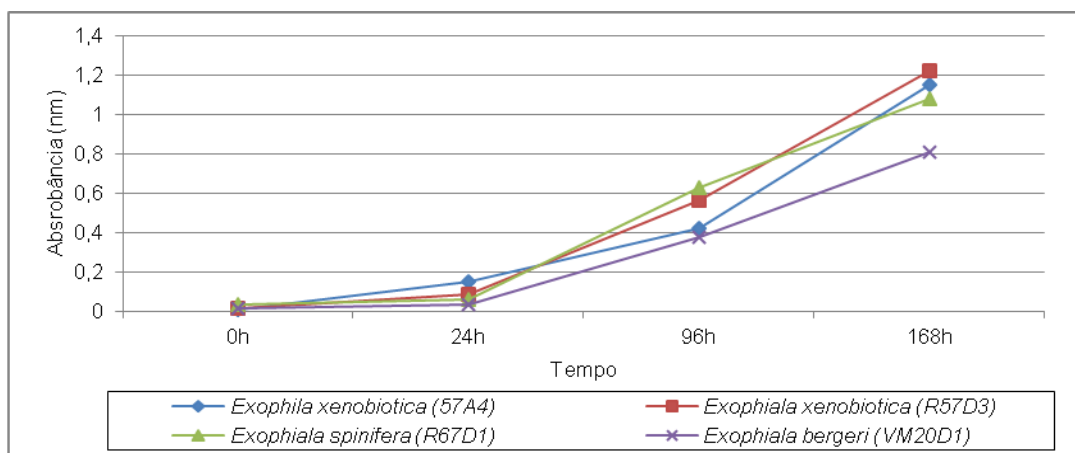


GRÁFICO 16 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Exophiala* EM MEIO MÍNIMO COM DEXTROSE E CORANTE REMAZOL AZUL (TRATAMENTO F), INCUBAÇÃO POR 7 DIAS, A 28 °C E 120 RPM.

Todos os isolados ambientais das diferentes espécies de *Exophiala* testados foram capazes de realizar a descoloração e quebra da ligação azo do corante tanto na presença quanto na ausência de uma fonte de carbono (GRÁFICO 17 e 18). No gráfico 17 foi apresentada as curvas referentes à cinética de descoloração do corante na ausência de uma fonte de carbono (dextrose) para os diferentes isolados de *Exophiala*.

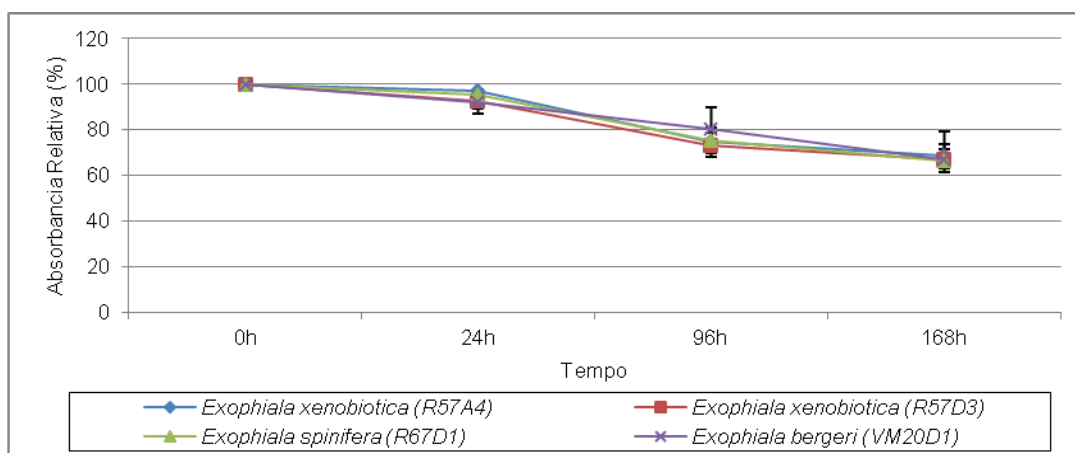


GRÁFICO 17 - CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL (AUSÊNCIA DE FONTE DE CARBONO) PARA OS ISOLADOS AMBIENTAIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Exophiala*.

Para que haja uma descoloração eficiente faz-se necessário à presença de uma fonte de carbono (GRÁFICO 18). Na ausência de uma fonte de carbono ocorreu uma redução de descoloração para aproximadamente 40% (GRÁFICO 17), significativamente distinto do meio com fonte de carbono (dextrose). A cinética de descoloração do corante na presença de uma fonte de carbono pode ser visualizada no gráfico 18.

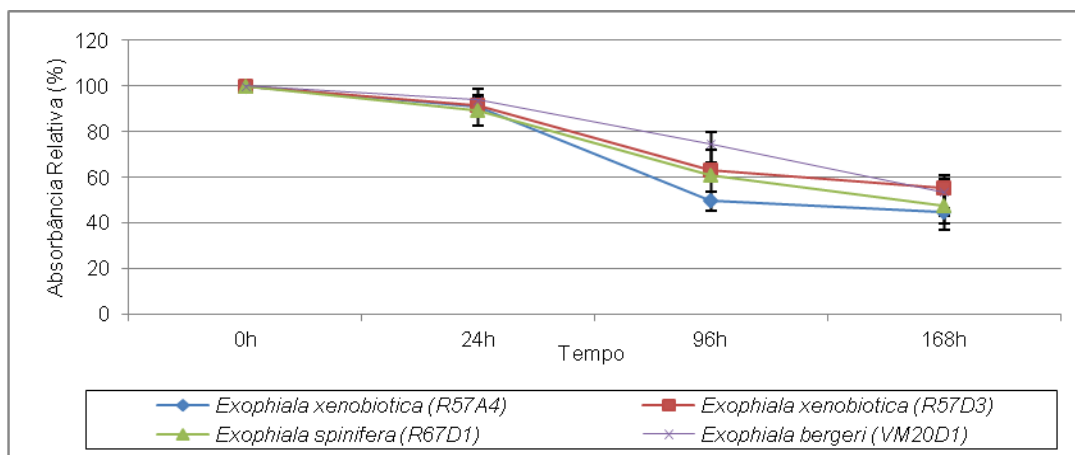


GRÁFICO 18 - CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL (PRESENÇA DE FONTE DE CARBONO) PARA OS ISOLADOS AMBIENTAIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Exophiala*.

Os resultados obtidos para *E. xenobiotica*, *E. spinifera* e *E. bergeri* mostraram que, a partir do tempo 196h de incubação, houve descoloração significativa pelas linhagens nas condições testadas, cerca de 45% na presença de uma fonte de carbono e 23% na ausência. A melhor atividade biodegradativa identificada através da descoloração do corante Remazol Azul foi à observada na isolado R57A4 de *E. xenobiotica* quando *cultivado* na presença da fonte de carbono dextrose. Na ausência da fonte carbono verificou-se um padrão de descoloração similar para todas as linhagens testadas, e de acordo com a análise estatística realizada não foram verificadas diferenças significativas quanto ao padrão de descoloração analisado entre as linhagens estudadas.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo investigaram-se aspectos ecológicos de espécies de leveduras negras de quatro gêneros (*Exophiala*, *Cladophialophora*, *Veronea* e *Capronia*) geneticamente relacionadas.

De acordo com a análise filogenética baseada nas sequências da região ITS verificou-se que a maioria das linhagens de *Exophiala* spp. procedentes de diversos substratos ambientais (TABELA 1) formou um subgrupo a parte entre as espécies de *E. spinifera* e *E. xenobiotica*. A posição de *E. xenobiotica* tão próxima de um patógeno como *E. Spinifera* e o fato destes isolados apresentarem crescimento a 36°C pode indicar um possível potencial patogênico. Hoog *et al.* (2006) ao descrever a espécie *E. xenobiotica*, verificou a partir da reconstrução filogenética que *E. spinifera* e *E. xenobiotica* ficaram próximas filogeneticamente e sugere ainda que esse relação possa indicar um potencial infeccioso em humanos (DE HOOG *et al.*, 2011).

As espécies do clado Salmonis e as espécies de *Exophiala* nascidas da água estão relacionadas filogeneticamente. O agrupamento formado e os resultados de temperatura e pH obtidos demonstraram que as espécies do clado Salmonis não possuem capacidade de causar doença em hospedeiros humanos, exceto por *V. botryosa*, a qual já foi relatada causando infecção em hospedeiros humanos (DE HOOG, 2011; BONIFAZ *et al.*, 2013). O clado Salmonis reúne as espécies aquáticas do gênero *Exophiala* com potencial de infecção em hospedeiros animais de sangue frio (DE HOOG, 2011).

No presente estudo, as espécies do clado Salmonis apresentaram um crescimento ótimo em torno de 24 e 27°C, com crescimento máximo de 36 °C, para *Veroneae botryosa*. As outras espécies de *Exophiala* apresentaram crescimento máximo entre 30 e 33°C e 40°C para *Exophiala angulospora*.

Os resultados obtidos estão de acordo com a natureza das espécies contidas no clado Salmonis que são mesófilos ou psicrotolerantes (DE HOOG, 2011). O estudo realizado por Porteous *et al.*, (2003) corrobora com os resultados deste trabalho, visto que ao avaliar a temperatura máxima de crescimento de várias espécies de *Exophiala* que incluem *E. pisciphila*, *E. angulospora*, *E. dopicola*, *E.*

*salmonis* e *E. mesophila* verificou que estas espécies apresentaram crescimento máximo a 35°C.

As linhagens de *Veronaea botryosa* avaliadas neste estudo apresentaram crescimento máximo a 36°C (HOOG *et al.* 2011). No estudo realizado por Chen *et al.*, (2006) constatou que *V. brotryosa* conseguiram sobreviver a 37°C. Esta espécie tem forte predileção por hospedeiros humanos e é um agente etiológico conhecido de infecções cutâneas e subcutâneas graves (CHEN *et al.*, 2006; HOOG *et al.*, 2011; BONIFAZ *et al.*, 2013).

As linhagens de *Exophiala* “nascidas da água” tiveram seu crescimento ótimo entre 24 e 27°C, apresentando um máximo de crescimento variando entre 30 a 36°C, exceto pela espécie de *E. alcalophila* que apresentou crescimento a 40°C. No estudo realizado por Porteus, (2003), *E. alcalophila* apresentou crescimento máximo a 37°C, diferentemente do observado neste trabalho. A linhagem de *Capronia coronata* apresentou crescimento máximo a 36°C. Untereiner *et al.* (1999), relata que a maioria das espécies de *Capronia* não crescem acima de 36°C, mas algumas podem crescer a 37°C.

As linhagens de *Cladophialophora* tiveram um crescimento ótimo em torno de 33°C, e ainda foram capazes de crescer a 40° C. Badali *et al.*, (2008) estudou espécies de *Cladophialophora* as quais apresentaram crescimento ótimo a 27°C e máximo a 37 °C. De Hoog *et al.*, (2000) afirmaram que as espécies de *Cladophialophora* apresentam diferentes temperaturas máximas de crescimento, sendo que as espécies que causam infecções sistêmicas são capazes de crescer a 40°C e que linhagens com crescimento até 37 °C, sem crescimento a 40°C, são em sua maioria, sapróbias apresentando algum potencial de virulência como oportunistas para hospedeiros humanos. (DE HOOG *et al.* 2000; BADALI *et al.*, 2008).

As linhagens de *E. bergeri* e *E. xenobiotica* apresentaram temperatura máxima de crescimento a 36°C, diferentemente de *E. spinifera* que o máximo observado foi 40°C. De Hoog *et al.*, (2006), em seu estudo determinou que a temperatura máxima de crescimento para *E. xenobiotica* é 36°C o que confirma os resultados obtidos neste estudo, e ponderou que esta espécie possui um caráter mais oportunista e que espécies relacionadas *E. bergeri* e *E. oligosperma*, também têm sido relatadas como causadoras de infecções oportunistas que são geralmente menos graves.



De maneira geral as linhagens incluídas neste estudo cresceram em uma ampla faixa de pH, com um ótimo variando em torno de 4,5 e 5,5. Estes resultados indicam que estes agentes representam um grupo específico quanto à ecologia, uma vez que de acordo com a literatura (DE HOOG *et al.*, 2000) a grande maioria dos fungos toleram uma ampla faixa de pH, mas com um ótimo variando em torno de 5 a 7. Neste estudo optou-se pela verificação do crescimento radial das colônias, visto que De Hoog *et al.*, (2000) afirmou que o crescimento radial seria a melhor maneira de obter melhor conhecimento sobre o desenvolvimento do fungo em diferentes condições. Recentemente, Zalar e colaboradores (2011) estudaram fungos isolados do ambiente de máquinas de lavar louças, e avaliaram o crescimento destes em quatro diferentes pH 2,5; 4; 10 e 12,5. Dentre os fungos estudados haviam espécies de *E. phaeomuriformis* e *E. dermatitidis*, e os autores verificaram que estas espécies foram capazes de crescer em todos os pH testados, confirmando assim o observado neste estudo quanto a capacidade destes micro-organismos de crescerem numa ampla faixa de pH.

Estevez; Veiga e Kennes, (2005), estudaram biodegradação de tolueno por *Paecilomyces variotii* e *E. oligosperma* em diferentes condições pH e temperatura. Os autores observaram que o intervalo de pH entre 5 e 6 foi considerado o melhor em relação aos resultados na biodegradação de tolueno. A partir dos resultados os autores concluíram que o pH é um importante parâmetro a ser considerado na biodegradação de compostos tóxicos e no crescimento do fungo de maneira geral. Dentro deste cenário, observou-se que as diferentes espécies de *Exophiala* avaliadas neste trabalho, em relação a degradação de óleo mineral e corante possuem um potencial de biodegradação. Os resultados de temperatura e pH baseado nas condições ótimas de crescimento destes isolados, podem auxiliar na determinação das melhores condições para degradação destes compostos.

A presença de melanina é outro importante fator de virulência e a sua produção está envolvida na patogenicidade de muitos fungos, incluindo os pertencentes à ordem *Chaetothyriales*, devido ao seu papel de proteção contra os radicais de oxigênio (FENG *et al.* 2012, SUN *et al.*, 2012).

A síntese das melaninas fúngicas e outros pigmentos estão associados à oxidação de compostos fenólicos por fenoloxidasas (lacase e tirosinase) (GRIFFITH, 1994). Neste estudo a verificação da produção de fenoloxidasas pela oxidação do ácido tânico se mostrou um substrato inespecífico para leveduras negras, uma vez

que apenas 6 linhagens foram positivas para esta enzima. Quando guaiacol foi utilizado como indicador da secreção de lacase, todas as linhagens estudadas tiveram reação positiva, mostrando-se uma metodologia mais específica e apropriada. Poiting (1999) discorreu acerca de diversas metodologias para determinação da produção enzimática em fungos e adicionou que a verificação da produção de fenoloxidasas pela oxidação do ácido tânico poderia ser dificultada, pois a cor acastanhada do halo formado era semelhante a muitos pigmentos produzidos naturalmente por fungos e, portanto, a interpretação dos resultados pode ser ambígua e sugeriu então utilizar outras metodologias. Sun *et al.* (2012), utilizou ABTS como indicador para atividade de lacase e o mesmo mostrou-se bastante sensível na detecção da enzima nas diferentes concentrações testadas. No estudo foram testadas 34 linhagens de *Fonsecaea* e todos foram positivas para atividade da enzima.

As leveduras negras podem ser encontradas em ambientes contaminados por hidrocarbonetos e essa característica pode indicar um potencial significativo para biorremediação destas leveduras. Os testes de assimilação realizados neste estudo revelaram que todas as linhagens testadas foram capazes de crescer na presença de óleo mineral ou corante Remazol Azul.

Tanto os isolados ambientais de *E. spinifera* quanto os de *E. xenobiotica* mostraram crescimento em todas as condições de cultura e foram capazes de assimilar os compostos testados, no entanto, os isolados de *E. spinifera* apresentaram maior crescimento na presença de óleo mineral enquanto que isolados de *E. xenobiotica* se desenvolveram melhor na presença de corante Remazol azul (tratamento E e F). Sendo que o isolado R57A4 de *E. xenobiotica* foi considerado o melhor degradador deste substrato, de acordo com a análise estatística realizada (ANEXO 4).

A espécie *E. xenobiotica* é frequentemente encontrada em ambientes ricos em hidrocarbonetos (DE HOOG *et al.*, 2006), podendo elucidar os resultados obtidos e o potencial que apresentado na degradação de hidrocarbonetos. De acordo com Satow *et al.* (2008) as diferenças encontradas na assimilação de hidrocarbonetos podem ser explicadas pelas diferentes características de hidrofobicidade que as leveduras negras apresentam, bem como pode ser devido à composição das substâncias testadas. Zhao *et al.* (2010), observou que a natureza extremofílica das leveduras negras da família *Herpotrichiellaceae*, em combinação com a sua

capacidade para metabolizar contaminantes aromáticos, torna-as organismos ideais para fins específicos de biorremediação.

Considerando os parâmetros avaliados neste estudo as espécies de *E. xenbiotica* foram as que apresentaram o maior potencial biodegradativo. Esta espécie apresentou crescimento máximo a 36°C e pode apresentar um caráter oportunista. A espécie de *E. spinifera* embora tenha apresentado potencial biodegradativo, tem uma temperatura máxima de crescimento a 40°C, o que representa um fator potencial de virulência. Tal fato tem sido demonstrado, uma vez que esta espécie tem sido frequentemente associada por diversos autores como causadora de infecções em humanos (PENAFRETA-BOLDU *et al.* 2006). Sendo assim, a espécie *E. xenbiotica* seria a mais indicada a ser explorada para fins de biorremediação.

Os fungos basiomicetos são os mais estudados e testados na biodegradação de corantes industriais, pois são capazes de tolerar elevadas concentrações de poluentes orgânicos, o que possibilita a aplicação destes organismos na biorremediação (BARR; AUST, 1994) Até o momento não se verificou muitos estudos sobre a capacidade descoloração de corantes industriais por leveduras negras.

Os resultados referentes à capacidade de degradação do corante Remazol azul, para as linhagens e isolados de *Exophiala* avaliados neste estudo, indicaram que estas leveduras tem uma capacidade de descoloração do corante o que provavelmente pode ser associado à capacidade de realizar a quebra da ligação azo do principal cromóforo do corante, como indicado por Niebish *et al* em 2009.

Ainda, a degradação deste corante geralmente ocorre por meio das enzimas fenoloxidasas (peroxidases, tirosinases e lacases). Essas enzimas são, em sua maioria, extracelulares e produzidas durante o metabolismo secundário, sendo induzidas pelo substrato (GLENN; GOLD, 1983). Resultados semelhantes aos deste estudo foi obtido por Niebish *et al.* 2010, que testou a descoloração e biogradeação do corante Remazol azul por *L. crinitus* e verificou que este micro-organismo tem a capacidade descolorir e biodegradar este corante. Neste mesmo estudo a descoloração total do corante ocorreu após 14 dias de incubação. Ravikumar *et al.* 2011, estudou a descoloração de efluente com corantes industriais por *Cladosporium cladosporides* onde foi obtido descoloração máxima de 52% após 10 dias de incubação.

Os resultados obtidos para as diferentes espécies de *Cladophialophora* e *Exophiala* (considerando os isolados ambientais e linhagens de referencia incluídos neste estudo) foram de grande importância na identificação de agentes promissores de biorremediação de interesse industrial. Através deste estudo foram identificados isolados ambientais com potencial biodegradativo promissor, além de esclarecer pontos importantes a respeito do nicho ambientais destas espécies de leveduras negras. A partir de estudos como este, pode se identificar isolados indicados para o tratamento de poluentes e resíduos ambientais, assim como, aqueles de potencial patogênico para hospedeiros humanos e animais.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nos parâmetros avaliados verificou-se que as linhagens estudadas apresentam uma ampla variação quanto à tolerância a temperatura, pH e atividade enzimática.

A análise molecular dos isolados foi essencial para a correta identificação dos isolados ambientais, bem como na reconstrução filogenética.

Verificou-se também que os diferentes isolados de *Exophiala* de origem ambiental têm diferentes potenciais de assimilação de óleo mineral e corante Remazol Azul demonstrando um possível potencial para a biorremediação.

*Exophiala xenobiotica*, *Exophiala spinifera* e *Exophiala bergeri* apresentaram grande atividade de biodegradação do corante Remazol Azul, sendo que a linhagem de *Exophiala xenobiotica* (R57A4), teve melhor atividade descorante.

## REFERÊNCIAS

- AL DOORY, Y. Chromomycosis. In: DI SALVO, A.F. Occupational mycoses. Philadelphia: **Lea & Febiger**, v.17,p.95-121, 1983.
- ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R. *et al.* Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces Production of Human Antifungal Antibodies and Enhances the Antimicrobial Efficacy of Phagocytes. **Infection and Immunity** , v. 72, n. 1, p. 229–237, 2004.
- ARORA, D. S., SHARMA, R. K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,v.160, p.1760-88, 2009.
- BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M. J. *et al.* Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in mycology**, v. 61, p. 175-91, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2610306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20/4/2012.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms of white rot fungi used to degrade pollutants. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 1, p.78A-87A, 1994.
- BAYLES, M.S.H. Chromoblastomycosis clinical tropical medicine and fisiology and diseases. International Practice and Research. **Intropical Ingal Infections**, v.4, n.1, p.45-71, 1989.
- BEEL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 24: p. 411-451, 1986.
- BOCCA, L, M.; BRITO, S. M. P. P.; FIGUEIREDO, F.; TOSTA, C. E. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in cromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia**. v. 161, p. 195-203, 2006.
- BOEGER, W. A; PIE, M. R.; OSTRENSKY, A.; PATELLA, L. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 161–7, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16021303>>. .
- BOEGER, W. A; PIE, M. R.; VICENTE, V. *et al.* Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. **Diseases of aquatic organisms**, v. 78, n. 1, p. 73–81, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18159675>>. Acesso em: 22/5/2012.
- BONIFAZ, A.; MOHAMMAD DAVOUDI, M.; DE HOOG, G S; *et al.* Severe Disseminated Phaeohyphomycosis in an Immunocompetent Patient Caused by *Veronaea botryosa*. **Mycopathologia**, v. 175, p. 497-503, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471534>>. Acesso em: 18/4/2013.

BRIDGE, P. D.; NEWSHAM, K. K. Soil fungal community composition at Mars Oasis, a southern maritime Antarctic site, assessed by PCR amplification and cloning. **Fungal Ecology**. v2, p. 66-74, 2009.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 44, p. 1115–1136, 1998.

BUTLER, M. J.; GARDINER, R. B.; DAY, A. W. Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi?. **Biol. Contr.**, v.32, p.332-336, 2005.

CALIGIORNE, R. B., RESENDE, M. A., OLIVEIRA, R. C. B. W., VALÉRIO, H. M., CORDEIRO, R. A., AZEVEDO, V. FUNGOS DEMATIÁCEOS: Fungos negros que afetam animais, plantas e o homem. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 11, p.22-25, 1999.

CALIGIORNE, R. B.; LICINIO, P.; DUPONT, J.; DE HOOG, G. S. Internal transcribed spacer rRNA gene-based phylogenetic reconstruction using algorithms with local and global sequence alignment for black yeasts and their relatives. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2816–2823, 2005.

CARMICHAEL, J. W. Cerebral mycetoma of trout due to a *Phialophora*-like fungus. **Sabouraudia**. v. 6, p.120–123, 1966.

CHAKRADEO, P. P. *et al.* Effect of benzo(a)pireno and methyl(acetoxymethyl)nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. **Cellular Biology International**, Amsterdam, v.17, n.7, p.671-676, 1993.

CHEN, Y. T.; LIN, H. C.; HUANG, C. C.; LO, Y. H. Cutaneous phaeo- hyphomycosis caused by an itraconazole and amphotericin B resistant strain of *Veronaea botryosa*. **Int J Dermatol**. v. 45, p.429–432, 2006.

CHIACCHIERINI, E., RESTUCCIA, D. & VINCI, G. Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases. **Food and Science Technology International**, v. 10, p. 373-382, 2004.

GUNDE-CIMERMAN, N.; SONJAK, S.; ZALAR, P.; FRISVAD, J.C.; DIDERICHSEN; B. AND PLEMENITAŠ, A. Extremophilic fungi in Arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. **Physics and Chemistry of the Earth** v. 28, p. 1273-1278, 2003.

CONCEIÇÃO, D. M.; DE ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; DE ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia (SP) e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, p. 99-106, 2005.

COX H. H. J.; FABER, B.W.; VAN HEINIGEN, W.N.M.; RADHOE H, DODDEMA HJ, HARDER, W. Styrene metabolism in *Exophiala jeanselmei* and involvement of a cytochrome P-450 dependent styrene monooxygenase. **Appl Environ Microbiol**. v 62, p.1471–1474, 1996.

DE HOOG, G. S.; MCGINNIS, M. R. Ascomycetous black yeasts. In: **The expanding realm of yeast-like fungi**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 187–199.

DE HOOG, G.S. Evolution of Black yeast: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.105-109, 1993.

DE HOOG, G.S. de; BOWMAN, B.; GRASER, Y.; HAASE, G.; ELFARI, M.; GARRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; MELZER-CRICK, B.; UNTEREINER, W.A. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. **Medical Mycology**, v.36, p.52-56, 1998.

DE HOOG GS DE, GERRITS VAN DEN ENDE AHG. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. **Mycoses**. v. 41, p.183–189, 1998.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Utrecht: Universitat Rovira i Virgili, 2000.

DE HOOG, G. S.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**, v. 42, n. 5, p. 405–416, 2004. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13693780410001661464>>. Acesso em: 9/5/2012.

FEIGENBAUM, A.U. Total quality control. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1991.

DE HOOG, G. S.; ZENG, J. S.; HARRAK, M. J. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 257-268, 2006.

DE HOOG, G. S.; NISHIKAKU, A. S.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; PADIN GONZALEZ, C. BURGER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**. v. 58, p.219-234, 2007.

DE HOOG, G S; VICENTE, V. A; NAJAFZADEH, M. J. *et al.* Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. **Persoonia**, v. 27, p. 46-72, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3251318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907-931, 2002.

EDENS, W.; GOINS, T.; DOOLEY, D.; HENSON, J. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *trici*. **Appl. Environ. Micro.** v. 65, p.3071-3074, 1999.

DIXON, D.M.; POLAK-WISS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification, *Mycoses*, v.34, p.1-18, 1991.



DURAN, N.; ESPOSITO, E.; Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Catal. B: Environ.**, v. 28, p. 83–99, 2000.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 19, p. 148-152, 2006.

ESTÉVEZ, E.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 33–37, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702332>>. Acesso em: 9/5/2012.

FENG, P.; LU, Q.; NAJAFZADEH, M. J. *et al.* Cyphellophora and its relatives in Phialophora: biodiversity and possible role in human infection. **Fungal Diversity**, v. 7, 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s13225-012-0194-5>>. Acesso em: 6/1/2013.

GRIFFITH, G.W. Phenoloxidases. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. *Aspergillus nidullans*: 50 years on progress in industrial microbiology. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**, 1994, p.763-788.

GOSTINČAR, C.; GRUBE, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evolution of fungal pathogens in domestic environments? **Fungal biology**, v. 115, n. 10, p. 1008–18, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944213>>. Acesso em: 12/12/2012.

GUNSCH, C. K.; CHENG, Q.; KINNEY, K. A.; SZANISZLO, P. J.; WHITMAN, C. P. Identification of a homogentisate-1 , 2-dioxygenase gene in the fungus *Exophiala lecanii-corni* : analysis and implications. v. 68, p. 405–411, 2005.

FENOLL, L. G., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N., GARCA-SEVILLA, F., GARCA-RUIZ, P. A., VARON, R., GARCA-CANOVAS, F., TUDELA, J. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. **Biochimica et Biophysica Acta/Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1548, p. 1-22, 2001.

FERREIRO, L.; SPANAMBERG, A.; BORBA, M. R.; SANCHES, E. M. C.; ROEHE, C.; SANTURIO, J. M.; CHERMETTE, R. Phaeohyphomycosis: an emerging animal fungal infection. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, n.2, p. 239-241, 2007.

GARG, S.K.; MODI, D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.19, p. 85-112, 1999.

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Descolorization of several dyes by a lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology** v. 45,p.1741-1747, 1983.

GUERRA, R. S.; DO NASCIMENTO, M. M. F.; MIESCH, S. *et al.* Black Yeast Biota in the Mangrove, in Search of the Origin of the Lethargic Crab Disease (LCD). **Mycopathologia**, , n. Lcd, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539353>>. Acesso em: 26/3/2013.

HALAOULI, S., ASTHER, M., SIGOILLOT, J. C., HAMDI, M. & LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.219-232, 2006.

ISOLA, D.; SELBMANN, L.; DE HOOG, G. S. *et al.* Isolation and Screening of Black Fungi as Degraders of Volatile Aromatic Hydrocarbons. **Mycopathologia**, v.175 p.369-379, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475324>>. Acesso em: 18/2/2013.

JACOBSON E, S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Veterinary**, v. 13, p.708–717, 2000.

JACQUES, J. R. S.; BENTO, F. M.; ANASTÁCIO, F.; CAMARGO, D. O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, v. 29, n. 1, p. 7–24, 2007.

KATAOKA, A. P. A. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”. 2001. 202f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biologia, **Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro, 2001.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p.3059–3066, 2002.

KOGEJ, T.; WHEELER, M. H.; RIZNER, T. L.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evidence for 1, 8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. **FEMS Microbiology**, v.232, p.203-209, 2004.

KNOW, K.J.; BENNET, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1992. 886p.

LANGVAD, F.; PEDERSEN, O.; ENGJOM, K. A fungal disease caused by *Exophiala* sp. nov. in farmed Atlantic salmon in Western Norway. In: Ellis AE (ed), **Fish and shellfish pathology**. London: Academic Publishers, 1985.

LI, D. M.; LI, R. Y.; DE HOOG, G. S.; WANG Y. X.; WANG, D. L. *Exophiala asiatica*, a new species from a fatal case in China. **Medical Mycology**. v. 47, p. 101–109, 2009.

LIBARDI JUNIOR, N. **Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos**. 140f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Departamento de Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, Santa Catarina, 2010.

LUYKX, D. M. A.; PRENAFETA-BOLDU, F. X.; DE BONT, J. A. M. Toluene monooxygenase from the fungus *Cladosporium sphaerospermum*. **Biochemistry Biophysics Reserch Community** v.312, p. 373–379, 2003.

MARTINEZ, R. L.; TOVAR, L. J. M. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**. v. 25, p. 188-194, 2007.

MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 58, p.582-594, 2002.  
<http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-2>.

MASCLAUX, F.; GUEHO, E.; DE HOOG, G. S. Phylogenetic relationships of human pathogenic *Cladosporium* (Xylohypha) species inferred from partial LSU rRNA sequences. **Journal of Medical Veterinary Mycolgy**, v.33, p.327-338, 1995.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants – recent progress. **Phytochemistry**, v. 26, p.11-20, 1987.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60; p.551-565, 2002.

MCGINNIS, M.R. Black fungi. A model for understanding tropical mycosis. In: WALKER, D. H. **Global infectious diseases**. New York: Springer Verlog, 1992, p.129-149.

MINUSSI, R. C. **Produção, purificação, caracterização e aplicação industrial de lacase fúngica**. Tese (Doutorado em Engenharia). Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2002.

MOMIN, A. Y.; RAGHUVANSHI, SR.; LANJEWAR, DN. Cutaneous chromoblastomycosis. **Bombay Hospital Journal**, v. 50, n. 2, p. 299-301, 2008.

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; GORBACHEVA, M. A.; SHLEEV, S. V.; YAROLOPOV, A. I. “Blue” Laccases. **Biochemistry**, v. 72, p. 1136 -1150, 2007.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V.; XI, L.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea nubica*, a new species of agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 48, n.6, p. 800-806, 2009

NETTO A.D.P. *et al.* Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.

NIEBISCH, C. H. **Biodegradação do corante têxtil remazol azul por *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* E *Hydnopolyporus fimbriatus***. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2009.

NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K. ; SCHADECK, R. ; MITCHELL, D. A. ; KAVA-CORDEIRO, V. ; PABA, J. . Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**. v.180, p.316-322, 2010.

NOSANCHUK; J. D., CASADEVALL, A.) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell. Microbiol.** v. 5, p. 203–223, 2003  
doi: 10.1016/j.fgb.2004.11.008.

OLIVEIRA, V. C.; VENDRUSCOLO, F. Produção de pigmentos alimentares por *Monascus ruber* CCT 3802 sob diferentes condições de pH. n. 62, 2007.

PADHYE, A.A.; DUNKEL, J.D.; WIN, R.M.; WEBER, S.; EWING, E.P.Jr.; HOOG, G.S.de. Short communication: subcutaneous phaeohyphomycoses caused by an undescribed *Cladophialophora* species. **Studies in Mycology**, v.43, p.172-175, 1999.

PEDERSEN, O. A. LANGVAD, F. *Exophiala psychrophila* sp. nov., a pathogenic species of the black yeasts isolated from Atlantic salmon. **Mycological Research**. v. 92, p. 153–156. 1989.

POINTING, S. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, n. March, p. 17-33, 1999. Disponível em: <[http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD\\_2\\_17-33.pdf](http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_2_17-33.pdf)>. Acesso em: 9/5/2012.

PORTEOUS, N. B.; GROOTERS, A. M.; REDDING, S. W.; THOMPSON, E. H.; RINALDI, M. G. *et al.* Identification of *Exophiala mesophila* isolated from treated dental unit waterlines. **Journal of Clinical Microbiology** v.41, p.3885–3889, 2003.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. *et al.* Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2660-2665, 2002.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; SUMMERBELL, R.; SYBREN DE HOOG, G. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? **FEMS Microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 109-30, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16438682>>. Acesso em: 22/3/2012.

PRINCE, R.C.; DRAKE, E.N. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D.C. *et al.* (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.89-110.

QUEIROZ, T. F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n.4. p.345-346 1997.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, VITALE, R. G. SALGADO, C. G. BONITAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestation, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v.47, n.1, p. 1-13, 2009.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003.

RAVIKUMAR, R.; VASANTHI, N. S.; SARAVANAN, K. Single factorial experimental design for decolorizing anaerobically treated distillery spent wash using *cladosporium cladosporioides*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 97–106, 2011.

REVANKAR, G. S.; PATTERSON, J. E.; SUTTON, D. A. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 34, p. 467-476, 2002.

RIBEIRO, E. L.; SOARES, A. J.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; NAVES, P. L. F.; DIAS, S.M. S. Cromoblastomycosis: present disease in brazilian population reality. **RBAC**. v. 38, n.3, p. 189-192, 2006.

RIBEIRO, R.O. **Doença do caranguejo letárgico**: desvendando questões etiológicas, epidemiológicas e de saúde pública. 98f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2008.

SATOW, M. M. **“Screening” de fungos degradadores de hidrocarbonetos complexos**. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado e Licenciatura) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2005.

SATOW, M. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; DE HOOG, G. S.; ANGELIS, D. F.; VICENTE, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in mycology**, v. 61, p. 157-63, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2610313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15/5/2012.

SATOW, M. M. **AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE IWATSU *et al.*, (1981) PARA ISOLAMENTO DE LEVEDURAS NEGRAS DO SOLO, DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, 2008.

SEO, S-Y, SHARMA, V. K. & SHARMA, N. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.2837-2853, 2003.

SEYEDMOUSAVI, S.; GUILLOT, J.; DE HOOG, G. S. Phaeohyphomycoses, emerging opportunistic diseases in animals. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 19-35, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23297257>>. Acesso em: 20/3/2013.

SINGH, N.; ARGARWAL, R.; GUPTA, D.; SHIRVAPRAKASH, M. R.; CHAKRABARTI, A. An unusual case de mediastinal mass due to *Fonsecaea pedrosoi*. **Eur. Respir**. v. 28, p. 662- 664, 2006.

STADEN, R, JUDGE D.P.; BONFIELD, J.K., Sequence assembly and finishing methods. **Methods of Biochemical Analysis**, v.43, p.303-22, 2001.

STERFLINGER, K.; DE HOOG, G. S.; HAASE, G. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 98–106, 1999.

STERFLINGER, K. Temperature and NaCl-tolerance of meristematic rock-inhabiting fungi. **Anton. van Lee.**, v. 74, p.271–281, 1998.

STERFLINGER, K. Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification. In: ROSA, C. e PÉTER, G. (Org.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 501-514, 2006.

STERFLINGER, K.; PRILLINGER, H. Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria). **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 80, p.275–286, 2001.

SILVA, F. DE A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. DE. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SUDHADHAM, M.; PRAKITSIN, S.; SIVICHA, S.; CHAIYARAT, R.; DORRESTEIN, G.M.; MENKEN, S. B. J.; DE HOOG, G.S. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. **Studies in Mycology.**, v. 61, p. 145–155, 2008.

SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; ENDE, A. H. G. G. VAN DEN; *et al.* Molecular Characterization of Pathogenic Members of the Genus *Fonsecaea* Using Multilocus Analysis.**Mycosis** , v. 7, n. 8, p. 1–10, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI M.;KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution.**, v. 28, p. 2731-2739., 2011.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology.**, v. 140, p. 19–26,1994.

TURK, M.; PLEMENITAŠ, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Extremophilic yeasts: plasma-membrane fluidity as determinant of stress tolerance. **Fungal biology**, v. 115, n. 10, p. 950–8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944207>>. Acesso em: 5/3/2013.

UNTEREINER, W. A.; VAN DEN ENDE, A. H. G. G.; DE HOOG, G. S. Nutritional physiology of species of *Capronia*. **Studies in Mycolgy.**, v. 43, p. 98–106. 1999.

VERSCHUEREN, K. Handbook of environmental data of organic chemicals. 4. ed. **Chichester**, England: Wiley, 2416p, 2001.

VISWANATH, B.; CHANDRA, M. S.; PALLAVI, H.; REDDY, B. R. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. v. 7, p. 1129-1133, 2008.

VICENTE, V. A; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in mycology**, v. 61, p. 137-44, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2610314&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12/4/2012.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose.** Tese (doutorado em Agronomia, Área de concentração: Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, 181 p., 2000.

VICENTE, V. A.; ORÉLIS-RIBEIRO, R.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GUERRA, R. S.; MIESCH, S.; OSTRENNY, A.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H.; DE HOOG, G. S.; BOEGER, W. A. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, v.158, p.109–122, 2012.

WHITE, T. J., BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A guide to methods and applications.** INNIS, M. A.; GELFAND, D. A.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. Academic Press, San Diego, U.S.A., 1990.

WOERTZ, J. R.; KINNEY, K.A.; MCINTOSH, N. D. P.; SZANISZLO, P. J.; Removal of toluene in a vapor-phase bioreactor containing a strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. **Biotechnol Bioeng.**, v. 75, p.550–558, 2001.

XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, p. 35, p.7608 – 7614, 1996.

YURLOVA, N. A., DE HOOG, G. S. FEDOROVA, L. G. The influence of ortho- and para-diphenoloxidase substrates on pigment formation in black yeast-like fungi. **Stud. Mycol.**, v. 61, p. 39-49. 2008.

ZALAR P, NOVAK M, DE HOOG GS, GUNDE-CIMERMAN N. Dishwashers a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. **Fungal Biol.**, v. 115, p. 997–1007, 2011.

ZENG, J. S. et al. Phylogeny of the *Exophiala spinifera* clado using multilocus sequence data and exploring phylogenetic species concept. In: ZENG, J.S. Developing **Species Recognition and Diagnostics of Rare Opportunistic Fungi.** 2007. Tese de doutorado, Universidade de Amsterdam, Amsterdam and Centraalbureau voor Schimmelcultuur, Utrecht, 2007. p. 85-106.

ZHAO, J.; ZENG, J.; DE HOOG, G. S.; ATTILI-ANGELIS, D.; PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. **Microbial ecology**, v. 60, n. 1, p. 149-56, 2010.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2917551&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9/5/2012.

## **ANEXOS**

ANEXO 1 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS .....	73
ANEXO 2 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS EM MEA 2% EM DIFERENTES TEMPERATURAS, APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO, MEDIANTE DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS EM MM. ....	77
ANEXO 3 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS EM MEA 2% EM DIFERENTES PH, APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO, MEDIANTE DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS EM MM.....	78
ANEXO 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	80



## ANEXO 1 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

### Meio Ágar Saboraud Dextrosado

Dextrose - 40g

Peptona - 10g

Agar - 15g

Água destilada – 1.000 mL

### Meio Ágar Extrato de Malte

Extrato de malte - 20 g

Dextrose - 20 g

Peptona - 1g

Água destilada - 1.000 mL

### Meio Mínimo com dextrose (MMCD)

$\text{NaNO}_3$  - 6g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,5g

KCl - 0,5g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5g

$\text{FeSO}_4$  - 0,01g

$\text{Zn SO}_4$  - 0,01g

Dextrose - 10g

Água destilada - 1.000 mL

#### Meio Mínimo sem dextrose (MMSD)

$\text{NaNO}_3$  - 6g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,5g

KCl - 0,5g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5g

$\text{FeSO}_4$  - 0,01g

$\text{Zn SO}_4$  - 0,01g

Água destilada - 1.000 mL

#### Solução salina a 0,85%

Cloreto de sódio – 8,5g

Água destilada – 1000ml

#### Solução Corante Remazol Azul 0, 1g/L

Remazol Brilhante Azul - 0,1g

Água destilada – 1.000 mL

Dissolver o corante em água. Após dissolução, esterilizar com filtro “Millipore”.

#### Tampão CTAB

Tris-base - 2,42 g

Cloreto de sódio - 8,2 g

NaEDTA - 2,0 g

Água destilada - 8,0 mL

O pH final foi ajustado para 7,5 com HCL 1N.

Tampão TBE (10x)

Tris-base - 108g

EDTA - 9,3g

Ácido Bórico - 55g

Água destilada - 1000mL

Clorofórmio Álcool isoamílico - CIA

Clorofórmio        96 mL

Álcool isoamílico        4 mL

TBE 5X

Tris-base    54,0 g

Ácido bórico    27,5 g

EDTA 0,5M    20 mL

Os sais foram dissolvidos em 800mL de água mili-Q. Completou-se o volume para 1000 mL.

TBE 1X

TBE 5X - 100 mL

Água milliQ 400 mL

## DNA Polimerase

Para as reações de amplificação foi utilizado Taq polimerase da marca Invitrogen com concentração de 5 U/ $\mu$ L.

## dNTP

Os desoxirribonucleotídeos dATP, dTTP, dGTP, dCTP foram diluídos em água ultra pura a 2,5 $\mu$ M. Foi utilizada a concentração final de 0,20  $\mu$ M para cada dNTP nas reações de amplificação.

## Gel de Agarose (0,8%)

Agarose - 0,8 g

Tampão TBE 1X - 100 mL

## Gel de Agarose (1,4%)

Agarose -1,4 g

Tampão TBE 1X - 100 mL

## Brometo de Etídio

O brometo de etídio 1,0% (p/v) foi dissolvido em água destilada, agitando-se por 2 horas. A solução foi estocada a temperatura ambiente. Para a revelação, foram diluídos em 3  $\mu$ L em água destilada.

ANEXO 2 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS EM MEA 2% EM DIFERENTES TEMPERATURAS, APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO, MEDIANTE DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS EM MM.

Número de Referencia		Nome	Temperatura (°C)									
			15	18	21	24	27	30	33	36	37	40
1	R45E1	<i>Cladophialophora devriesii</i>	4	11	17	25	30	32	19	6	3	2
2	R26A3	<i>Cladophialophora</i> sp.	10	13	23	34	37	43	36	16	5	2
3	VM20D1	<i>Exophiala bergeri</i>	8	16	22	33	36	31	23	3	-	-
4	R32E3	<i>Exophiala</i> sp.	7	10	13	16	19	13	4	1	-	-
5	R57D1	<i>Exophiala spinifera</i>	8	17	23	36	40	44	32	12	7	4
6	R67D1	<i>Exophiala spinifera</i>	13	19	22	25	28	32	19	10	5	4
7	R68C1	<i>Exophiala spinifera</i>	10	16	23	36	40	45	33	18	8	3
8	R68E1	<i>Exophiala spinifera</i>	9	15	20	24	28	31	23	8	5	2
9	R68E2	<i>Exophiala spinifera</i>	14	20	25	34	38	42	31	14	8	4
10	VM17A1	<i>Exophiala spinifera</i>	12	16	21	24	29	33	23	10	6	3
11	VM20E6	<i>Exophiala spinifera</i>	11	16	20	24	28	32	21	5	3	1
12	R57A4	<i>Exophiala xenobiotica</i>	9	12	17	20	24	27	15	6	-	-
13	R57D3	<i>Exophiala xenobiotica</i>	6	10	15	18	21	25	14	5	-	-
14	CBS 617.96	<i>Capronia coronata</i>	9	14	18	22	25	17	11	5	-	-
15	CBS117497	<i>Exophiala lacus</i>	7	10	12	16	8	2	-	-	-	-
16	CBS 121497	<i>Exophiala mesophila</i>	8	11	16	19	22	14	4	-	-	-
17	CBS 109147	<i>Exophiala mesophila</i>	9	13	18	21	24	15	5	-	-	-
18	CBS 121508	<i>Exophiala mesophila</i>	9	14	17	21	23	13	4	-	-	-
19	CBS 836.95	<i>Exophiala mesophila</i>	8	13	18	21	23	12	3	-	-	-
20	CBS 402.95	<i>Exophiala mesophila</i>	6	9	11	14	18	10	2	-	-	-
21	CBS 118722	<i>Exophiala alcalophila</i>	4	6	13	19	25	17	10	8	5	3
22	CBS 521.82	<i>Exophiala alcalophila</i>	5	7	11	17	23	16	10	6	3	2
23	CBS 120272	<i>Exophiala angulospora</i>	6	11	13	15	16	11	5	-	-	-
24	CBS 146.93	<i>Exophiala angulospora</i>	5	8	11	13	16	13	5	-	-	-
25	CBS 122264	<i>Exophiala angulospora</i>	6	7	10	13	15	12	4	-	-	-
26	CBS 121512	<i>Exophiala halophila</i>	5	7	11	13	17	11	3	-	-	-
27	CBS 121499	<i>Exophiala halophila</i>	4	7	9	13	16	10	2	-	-	-
28	CBS 120417	<i>Exophiala aquamarina</i>	10	17	24	30	35	29	21	3	-	-
29	CBS 119921	<i>Exophiala aquamarina</i>	11	18	26	30	34	26	20	4	-	-
30	CBS 587.66	<i>Exophiala brunnea</i>	8	13	18	24	19	13	5	-	-	-
31	CBS 117491	<i>Exophiala cancerae</i>	9	13	19	23	17	9	3	-	-	-
32	CBS 115142	<i>Exophiala cancerae</i>	10	12	15	18	14	7	2	-	-	-
33	CBS120420	<i>Exophiala cancerae</i>	8	11	14	16	11	5	1	-	-	-
34	CBS 631.69	<i>Exophiala opportunistica</i>	11	16	21	23	13	2	0	-	-	-
35	CBS 637.69	<i>Exophiala opportunistica</i>	13	19	23	25	18	5	0	-	-	-
36	CBS 109811	<i>Exophiala opportunistica</i>	6	10	13	15	8	2	0	-	-	-
37	CBS 119913	<i>Exophiala pisciphila</i>	10	17	22	27	32	20	4	-	-	-
38	CBS 121505	<i>Exophiala pisciphila</i>	10	17	22	27	30	20	4	-	-	-
39	CBS 110371	<i>Exophiala salmonis</i>	11	15	18	22	16	11	3	-	-	-
40	CBS 254.57	<i>Veronea botryosa</i>	12	18	25	32	40	34	27	7	-	-
41	CBS 121506	<i>Veronea botryosa</i>	9	17	22	30	41	35	26	5	-	-
42	CBS 101462	<i>Veronea botryosa</i>	7	16	24	29	35	32	21	4	-	-
43	CBS 102593	<i>Veronea botryosa</i>	8	13	22	27	36	31	20	5	-	-

ANEXO 3 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS EM MEA 2% EM DIFERENTES PH, APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO, MEDIANTE DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS EM MM.

COLONIAS EM MM.									
Número	Nome		pH						
			2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5
1	R45E1	<i>Cladophialophora devriesii</i>	23	25	27	29	30	31	32
2	R26A3	<i>Cladophialophora</i> sp.	32	36	38	43	47	44	43
3	VM20D1	<i>Exophiala bergeri</i>	28	34	38	41	35	29	25
4	R32E3	<i>Exophiala</i> sp.	33	36	39	43	40	37	34
5	R57D1	<i>Exophiala spinifera</i>	18	20	22	23	24	27	29
6	R67D1	<i>Exophiala spinifera</i>	17	19	20	21	22	26	28
7	R68C1	<i>Exophiala spinifera</i>	19	20	21	22	23	24	26
8	R68E1	<i>Exophiala spinifera</i>	18	20	21	23	24	26	27
9	R68E2	<i>Exophiala spinifera</i>	16	18	20	22	23	25	26
10	VM17A1	<i>Exophiala spinifera</i>	15	17	19	21	23	26	27
11	VM20E6	<i>Exophiala spinifera</i>	18	19	20	22	24	25	26
12	R57A4	<i>Exophiala xenobiotica</i>	12	13	15	19	25	21	18
13	R57D3	<i>Exophiala xenobiotica</i>	11	12	14	18	24	20	17
14	CBS 617.96	<i>Capronia coronata</i>	9	11	13	16	19	17	15
15	CBS117497	<i>Exophiala lacus</i>	18	22	25	27	29	33	36
16	CBS 121497	<i>Exophiala mesophila</i>	9	11	14	15	18	22	20
17	CBS 109147	<i>Exophiala mesophila</i>	10	12	13	14	17	21	19
18	CBS 121508	<i>Exophiala mesophila</i>	10	11	12	13	16	20	18
19	CBS 836.95	<i>Exophiala mesophila</i>	8	10	11	14	15	19	19
20	CBS 402.95	<i>Exophiala mesophila</i>	9	10	11	15	16	20	18
21	CBS 118722	<i>Exophiala alcalophila</i>	11	13	14	16	14	13	12
22	CBS 521.82	<i>Exophiala alcalophila</i>	12	13	13	15	13	12	11
23	CBS 120272	<i>Exophiala angulospora</i>	5	7	9	12	17	15	15
24	CBS 146.93	<i>Exophiala angulospora</i>	6	8	10	11	16	14	14
25	CBS 122264	<i>Exophiala angulospora</i>	7	9	11	13	18	16	15
26	CBS 121512	<i>Exophiala halophila</i>	9	10	12	13	12	11	10
27	CBS 121499	<i>Exophiala halophila</i>	10	11	13	14	13	10	9
28	CBS 120417	<i>Exophiala aquamarina</i>	9	11	12	15	21	26	31
29	CBS 119921	<i>Exophiala aquamarina</i>	7	9	11	14	20	25	30
30	CBS 587.66	<i>Exophiala brunnea</i>	8	10	13	15	19	16	15
31	CBS 117491	<i>Exophiala cancerae</i>	19	21	23	24	27	30	28
32	CBS 115142	<i>Exophiala cancerae</i>	18	19	22	23	25	28	27
33	CBS120420	<i>Exophiala cancerae</i>	16	17	20	22	23	27	25
34	CBS 631.69	<i>Exophiala opportunistica</i>	15	17	19	20	22	24	27
35	CBS 637.69	<i>Exophiala opportunistica</i>	15	17	19	20	22	24	27
36	CBS 109811	<i>Exophiala opportunistica</i>	15	17	19	20	22	24	27
37	CBS 119913	<i>Exophiala pisciphila</i>	18	22	24	25	28	33	36
38	CBS 121505	<i>Exophiala pisciphila</i>	17	20	23	24	26	31	34
39	CBS 110371	<i>Exophiala salmonis</i>	17	22	24	25	26	31	34
40	CBS 254.57	<i>Veronea botryosa</i>	24	27	30	32	36	39	45
41	CBS 121506	<i>Veronea botryosa</i>	23	25	28	31	33	38	44
42	CBS 101462	<i>Veronea botryosa</i>	22	24	27	32	34	37	43
43	CBS 102593	<i>Veronea botryosa</i>	24	26	30	32	35	39	45

ANEXO 3 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ESTUDADAS EM MEA 2% EM DIFERENTES PH, APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO, MEDIANTE DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS EM MM.

	Número	Nome	pH						
			6	6,5	7	7,5	8	8,5	9
1	R45E1	<i>Cladophialophora devriesii</i>	34	38	36	34	33	32	30
2	R26A3	<i>Cladophialophora</i> sp.	42	42	41	40	38	35	34
3	VM20D1	<i>Exophiala bergeri</i>	20	18	16	15	14	13	12
4	R32E3	<i>Exophiala</i> sp.	32	30	28	27	25	24	23
5	R57D1	<i>Exophiala spinifera</i>	26	22	20	19	18	18	17
6	R67D1	<i>Exophiala spinifera</i>	25	21	19	18	17	16	16
7	R68C1	<i>Exophiala spinifera</i>	24	20	18	18	17	17	16
8	R68E1	<i>Exophiala spinifera</i>	25	22	20	19	18	16	15
9	R68E2	<i>Exophiala spinifera</i>	24	20	20	19	18	17	15
10	VM17A1	<i>Exophiala spinifera</i>	23	19	19	18	17	17	16
11	VM20E6	<i>Exophiala spinifera</i>	24	19	18	18	17	16	15
12	R57A4	<i>Exophiala xenobiotica</i>	17	15	14	13	12	9	8
13	R57D3	<i>Exophiala xenobiotica</i>	15	14	13	12	11	8	7
14	CBS 617.96	<i>Capronia coronata</i>	14	13	12	12	11	10	8
15	CBS117497	<i>Exophiala lacus</i>	33	32	31	30	29	28	27
16	CBS 121497	<i>Exophiala mesophila</i>	19	17	16	15	14	14	13
17	CBS 109147	<i>Exophiala mesophila</i>	18	16	16	14	13	12	11
18	CBS 121508	<i>Exophiala mesophila</i>	17	16	15	15	14	13	12
19	CBS 836.95	<i>Exophiala mesophila</i>	15	15	15	14	13	12	11
20	CBS 402.95	<i>Exophiala mesophila</i>	16	15	14	13	13	12	11
21	CBS 118722	<i>Exophiala alcalophila</i>	11	11	9	8	6	5	5
22	CBS 521.82	<i>Exophiala alcalophila</i>	10	10	8	7	5	5	5
23	CBS 120272	<i>Exophiala angulospora</i>	14	13	13	12	12	11	11
24	CBS 146.93	<i>Exophiala angulospora</i>	13	12	12	11	11	10	9
25	CBS 122264	<i>Exophiala angulospora</i>	14	14	11	11	10	9	8
26	CBS 121512	<i>Exophiala halophila</i>	9	8	7	7	6	5	5
27	CBS 121499	<i>Exophiala halophila</i>	8	7	7	6	5	5	4
28	CBS 120417	<i>Exophiala aquamarina</i>	28	26	25	25	22	20	19
29	CBS 119921	<i>Exophiala aquamarina</i>	27	25	24	24	21	19	18
30	CBS 587.66	<i>Exophiala brunnea</i>	15	14	14	13	12	11	11
31	CBS 117491	<i>Exophiala cancerae</i>	27	26	25	24	23	22	21
32	CBS 115142	<i>Exophiala cancerae</i>	26	25	24	23	22	21	20
33	CBS120420	<i>Exophiala cancerae</i>	24	23	22	21	20	18	17
34	CBS 631.69	<i>Exophiala opportunistica</i>	25	24	23	23	22	21	19
35	CBS 637.69	<i>Exophiala opportunistica</i>	24	23	22	21	20	20	18
36	CBS 109811	<i>Exophiala opportunistica</i>	24	23	23	22	22	21	19
37	CBS 119913	<i>Exophiala pisciphila</i>	32	31	30	28	27	26	19
38	CBS 121505	<i>Exophiala pisciphila</i>	32	30	29	27	26	26	19
39	CBS 110371	<i>Exophiala salmonis</i>	38	35	34	33	31	29	25
40	CBS 254.57	<i>Veronea botryosa</i>	43	41	40	39	39	38	25
41	CBS 121506	<i>Veronea botryosa</i>	42	40	39	38	38	38	30
42	CBS 101462	<i>Veronea botryosa</i>	42	40	38	38	37	36	36
43	CBS 102593	<i>Veronea botryosa</i>	41	41	40	39	39	38	34

#### ANEXO 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

TABELA 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA ASSIMILAÇÃO DE ÓLEO MINERAL E CORANTE REMAZOL AZUL ISOLADO AMBIENTAL *Exophiala xenobiotica* (R57A4)

##### EXPERIMENTO FATORIAL

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	5	3.36608	0.67322	141.8863 **
Fator2(F2)	3	5.78645	1.92882	406.5160 **
Int. F1xF2	15	2.16152	0.14410	30.3706 **
Tratamentos	23	11.31404	0.49191	103.6756 **
Blocos	3	0.02661	0.00887	1.8695 ns
Resíduo	69	0.32739	0.00474	
Total	95	11.66804		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA ASSIMILAÇÃO DE ÓLEO MINERAL E CORANTE REMAZOL AZUL ISOLADO AMBIENTAL *Exophiala xenobiotica* (R57D3)

##### EXPERIMENTO FATORIAL

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	5	4.85456	0.97091	280.4093 **
Fator2(F2)	3	7.35156	2.45052	707.7354 **
Int. F1xF2	15	3.77283	0.25152	72.6421 **
Tratamentos	23	15.97896	0.69474	200.6471 **
Resíduo	72	0.24930	0.00346	
Total	95	16.22826		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA ASSIMILAÇÃO DE ÓLEO MINERAL E CORANTE REMAZOL AZUL ISOLADO AMBIENTAL *Exophiala spinifera* (R67D1)

##### EXPERIMENTO FATORIAL

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	5	3.47538	0.69508	130.2807 **
Fator2(F2)	3	8.22857	2.74286	514.1037 **



Int. F1xF2	15	3.31963	0.22131	41.4807 **
Tratamentos	23	15.02358	0.65320	122.4316 **
Resíduo	72	0.38414	0.00534	
Total	95	15.40772		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA ASSIMILAÇÃO DE ÓLEO MINERAL E CORANTE REMAZOL AZUL ISOLADO AMBIENTAL *Exophiala bergeri* ( VM20D1)

#### EXPERIMENTO FATORIAL

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	5	1.63930	0.32786	117.3552 **
Fator2(F2)	3	4.38470	1.46157	523.1581 **
Int. F1xF2	15	1.13476	0.07565	27.0787 **
Tratamentos	23	7.15875	0.31125	111.4100 **
Resíduo	72	0.20115	0.00279	
Total	95	7.35990		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

TABELA 5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL ISOLADO AMBIENTAL *Exophiala xenobiotica* ( R57D3)

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	5673.98112	1891.32704	83.0193 **
Resíduo	12	273.38136	22.78178	
Total	15	5947.36248		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

TABELA 6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL PELO ISOLADO AMBIENTAL *Exophiala spinifera* ( R67D1)

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	7132.06701	2377.35567	83.0365 **
Resíduo	12	343.56289	28.63024	
Total	15	7475.62990		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	12	5.9525	83.0365	<0.001

TABELA 7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA CINÉTICA DA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL ISOLADO AMBIENTAL *Exophiala bergeri* (VM20D1)

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	5283.84525	1761.28175	44.2146 **
Resíduo	12	478.01843	39.83487	
Total	15	5761.86368		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

TABELA 8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL PELO ISOLADO AMBIENTAL *Exophiala xenobiotica* (R57A4)

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	9565.22784	3188.40928	91.8330 **
Resíduo	12	416.63579	34.71965	
Total	15	9981.86363		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )